

UNTERSUCHUNGEN ZUR METABOLISCHEN AKTIVIERUNG DES PRÄKANZEROGENS
BENZO(a)PYREN IN ISOLIERT PERFUNDIERTEN ORGANEN VON RATTE UND MAUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaft"
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von
Erik Klaus
geb. in Wiesbaden

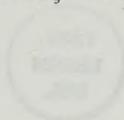
Mainz 1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR METABOLISCHEN AKTIVIERUNG DES PRÄKANZEROGENS
BENZO(a)PYREN IN ISOLIERT PERFUNDIERTEN ORGANEN VON RATTE UND MAUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaft"
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz



vorgelegt von
Erik Klaus
geb. in Wiesbaden

Mainz 1980



Dekan: Prof. Dr. H. Risler

Berichterstatter: Prof. Dr. G.F. Kahl
Prof. Dr. K. Urich

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.1980

Die vorliegende Arbeit wurde im Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. K. Urich danke ich für die Unterstützung und Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.F. Kahl, Pharmakologisches Institut, für die Vergabe des Themas und die intensive Anleitung bei der Bearbeitung der Problematik.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. E i n l e i t u n g	1
Ausscheidung lipophiler Xenobiotika	1
Enzymsysteme der Monooxygenierung	2
Induzierbarkeit und differentielle Inhibition	5
Verbreitung von Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase und von Benzo(a)pyren	8
Chemische Karzinogenese	9
II. Z i e l d e r A r b e i t	12
III. M a t e r i a l u n d M e t h o d e n	14
1. Versuchstiere und Haltung	14
2. Vorbehandlung der Versuchstiere	14
3. Perfusionstechniken	14
3.1. Apparatur	14
3.2. Perfusionsmedium	16
3.3. Präparation	17
3.3.1. Operationstechnik bei Rattenleberperfusion	17
3.3.2. Operationstechnik bei Rattenlungenperfusion	18
3.3.3. Operationstechnik bei Mäuseleberperfusion	19
3.4. Durchführung der Perfusionsversuche	19
3.5. Sauerstoffmessungen	20
4. Inkubation von Lungen-Schnitten	21
5. Isotopen-Techniken	22
5.1. Verwendeter Tracer	22
5.2. Radioaktivitätsmessungen	22
5.3. Bilanz-Berechnungen	23
6. Aufarbeitung der Organe	23
6.1. Isolierung von DNA, RNA und Protein	23
6.2. Bestimmung der Makromoleküle und der irreversiblen Bindung	25
6.3. Herstellung und Untersuchung der Mikrosomenfraktion	26
7. Auftrennung von Benzo(a)pyren-Metabolit-Nukleosid-Addukten	26
7.1. Hydrolyse der Nukleinsäuren	26
7.2. Säulenchromatographische Techniken	27
7.2.1. Chromatographie-Säule und Fraktionssammler	27
7.2.2. Auftragen der Probe und Chromatographie	28
7.2.3. Identifikation der Addukte	28
8. Reagenzien und Chemikalien	29
9. Auswertung der Ergebnisse und statistische Verfahren	30

Experiment A: Rattenleberperfusionen(Induktoren und Inhibitoren)

31

Modifikation der Mikrosomenfraktion durch
Monooxygenase-Induktoren 31

Modifikation der irreversiblen Bindung durch
Monooxygenase-Induktoren 32

Modifikation der irreversiblen Bindung durch
Monooxygenase-Inhibitoren 33

Irreversible Bindung bei Anwesenheit eines
Epoxidhydratase-Inhibitors 34

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von
Benzo(a)pyren-Metaboliten 35

Modifikation der biliären Exkretion von Benzo(a)pyren
durch Monooxygenase-Induktoren 38

Experiment B: Rattenleberperfusionen (Zeitverläufe)

40

Zeitverlauf der Benzo(a)pyren-Konzentrationen in
Perfusat, Gewebe und Galle 40

Zeitverlauf der irreversiblen Bindung 42

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von
Benzo(a)pyren-Metaboliten 44

Experiment C: Rattenlungenperfusionen (Induktoren)

48

Modifikation der irreversiblen Bindung durch
Monooxygenase-Induktoren 48

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von
Benzo(a)pyren-Metaboliten 49

Experiment D: Kombiniertes PerfusionssystemRattenleber-Rattenlunge

51

Experiment E: Mäuseleberperfusionen

54

Konzentrationsabhängigkeit der irreversiblen Bindung 54

Modifikation der irreversiblen Bindung bei genetisch
"responsiven" und "nicht-responsiven" Mäusestämmen 55

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von
Benzo(a)pyren-Metaboliten 56

<u>Experiment F: Mäuselungen-Schnitte</u>	58
Modifikation der irreversiblen Bindung bei genetisch "responsiven" und "nicht-responsiven" Mäusestämmen	58
Vergleich der Bindungswerte in Lungenschnitten und perfundierten Lungen	59
Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten	60
 V. D i s k u s s i o n	 62
 VI. Z u s a m m e n f a s s u n g	 78
 VII. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	 80

Abkürzungen

α -NF	α -Naphthoflaven
β -NF	β -Naphthoflaven
BP	Benzo(a)pyren
DNA	Desoxyribonukleinsäure
KG	Körpergewicht
MC	3-Methylcholanthren
MP	Metyrepon
PB	Phenobarbital
RNA	Ribonukleinsäure
TCPD	3,3,3-Trichlorpropylenoxid

I. E i n l e i t u n g

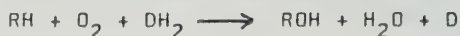
Ausscheidung lipophiler Xenobiotika

Organismen sind im Lauf ihres Lebens einer Vielzahl chemischer Substanzen ausgesetzt, die nicht in den Intermediärstoffwechsel der Organe eingeschleust werden können und die daher eliminiert werden müssen. Höher differenzierte Lebewesen wie die Säuger produzieren einen Teil dieser Stoffe, zu denen Steroidhormone, Bilirubin, biogene Amine sowie Fett- und Gallensäuren gehören, selbst; viele Verbindungen werden auch aus der Umwelt beispielsweise durch die Nahrung, durch die Atemluft oder durch die Körperoberfläche aufgenommen. Das Spektrum der Fremdstoffe oder "Xenobiotika" erweitert sich ständig durch neue Chemikalien wie z.B. Arzneimittel, flüchtige industrielle Abfallprodukte, Schädlingsbekämpfungsmittel und Nahrungszusatzstoffe. Manche dieser Substanzen sind relativ unpolar und bedürfen deshalb, um über den Harn und die Galle ausgeschieden werden zu können, einer chemischen Umwandlung zu mehr wasserlöslichen Verbindungen. Die Fähigkeit, unpolare Substrate durch Metabolisierung eliminierbar zu machen, ist lebenswichtig, da die lipophilen Substanzen sich sonst im Körpergewebe, besonders in den Membranen, anreichern und dadurch Störungen im Stoffwechsel hervorrufen würden (WILLIAMS, 1971).

Die chemischen Veränderungen, die vom Organismus an Fremdstoffen vorgenommen werden (Biotransformationen), sind bei Mensch und anderen Säugern qualitativ gleich und lassen sich in vier Gruppen einteilen. Hydrolytische Reaktionen werden von unspezifischen Hydrolasen vermittelt wie der ubiquitär in den Geweben und im Blutplasma anzutreffenden Pseudocholinesterase, durch die vor allem solche Fremdstoffe, die Ester sind, gespalten werden. Daran können sich Konjugationsschritte mit polaren Molekülen wie aktivierter Glucuronsäure, akt. Sulfat oder Aminosäuren anschließen. Solche Konjugationen findet man in der Regel auch, wenn die

Körperfremde Verbindung selbst mindestens eine funktionelle Gruppe aufweist wie z.B. eine Hydroxy- oder Aminogruppe. Als dritte Möglichkeit kommen reduktive Prozesse in Betracht, durch die beispielsweise Azo- und Nitrogruppen zu Aminogruppen reduziert werden, die dann wiederum der Konjugation unterliegen können.

Da nur ein kleiner Teil der lipophilen Xenobiotika den enzymatischen Hydrolysen, Konjugationen oder Reduktionen zugänglich ist, erhält der vierte Reaktionsmechanismus eine überragende Bedeutung: die Hydroxylierung mit molekularem Sauerstoff, die aufgrund der folgenden Stöchiometrie als "Monooxygenierung" bezeichnet wird:



Danach wird zur Hydroxylierung des Substrats RH unter Mitwirkung eines Wasserstoffdonators DH_2 ein Atom des Sauerstoffmoleküls verwendet, während das zweite zu Wasser reduziert wird. Als Lieferant von Reduktionsäquivalenten tritt häufig NADPH auf, wobei ein flavinhaltiges Enzym zwischengeschaltet sein kann. Auch hier findet oft nach erfolgter Oxidation des Substrats, die ebenso wie Reduktion oder Hydrolyse auch als Phase I der Biotransformation bezeichnet wird, in einem zweiten metabolischen Schritt (Phase II) eine Konjugation statt.

Enzysysteme der Monooxygenierung

Während manche Enzyme zur Metabolisierung von Fremdstoffen, die einer Hydrolyse, Reduktion und/oder Konjugation zugänglich sind, auch im Cytoplasma lokalisiert sind, liegen sowohl die substratspezifischen als auch die unspezifischen Monooxygenasen, die Hydroxylierungen von meist sehr lipophilen Substraten katalysieren, membrangebunden überwiegend im nicht-ribosomenhaltigen, sog. "glatten", endoplasmatischen Retikulum vor. In besonders hoher Ausbeute lassen sich von Leberparenchymzellen (Hepatozyten) aus diesem Membransystem durch Gewebshomogenisierung und Differentialzentrifugation isolieren.

fugation Partikeln gewinnen, die als Mikrosomen bezeichnet werden (CLAUDE, 1938). Solche Mikrosomenfraktionen besitzen noch die intakten Enzymsysteme des aufgebrochenen endoplasmatischen Retikulums, von dessen Proteingehalt bis zu 30 % auf das Monooxygenasesystem entfallen kann (ULLRICH, 1977). Die überaus starke Beachtung, die die Mikrosomen in den letzten drei Dezennien bei den meisten der über den hepatischen Stoffwechsel durchgeführten Studien gefunden haben, ist verständlich, erfaßt doch die hepatische Monooxygenierung ca. 2/3 der gesamten Biotransformationsaktivität des Organismus (ACKERMANN, 1978).

Schlüsselenzyme des Monooxygenasesystems sind verschiedene "Cytochrome P-450", Proteine, die ursprünglich von KLINGENBERG (1958) und GARFINKEL (1958) als CO-bindende Pigmente beschrieben wurden und deren Namen von ihrem spektroskopischen Verhalten herrührt: Der CO-Komplex des reduzierten Cytochroms P-450 weist im Differenzspektrum der Mikrosomen eine Absorptionsbande bei 450 nm auf, deren Ausmaß auch eine Quantifizierung des Cytochrom P-450-Gehalts zuläßt (OMURA und SATO, 1964). Beim Cytochrom P-450 mit seinem Eisen-Porphyrin-Zentrum handelt es sich um ein Cytochrom vom b-Typ (OMURA und SATO, 1962). In der Mikrosomenfraktion existiert noch ein weiteres Häm-Protein vom b-Typ, das Cytochrom b_5 (STRITTMATTER und BALL, 1954). Daneben enthält das Monooxygenasesystem im endoplasmatischen Retikulum noch Flavoproteine wie die NADPH-Cytochrom c-Reduktase und die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase sowie bestimmte Phospholipide.

Der Mechanismus der mikrosomalen Oxidation läßt sich in mehrere Teilreaktionen untergliedern. Zunächst bindet das zu oxidierende Substrat an das aktive Zentrum des Cytochrom P-450, dessen Häm-Eisen unter den aeroben Bedingungen der Zelle im dreiwertigen Zustand vorliegt. Im Enzym-Substrat-Komplex wird das Cytochrom-Eisen dann durch Übertragung eines Elektrons vom NADPH durch die NADPH-Cytochrom c-Reduktase zur zweiwertigen Form reduziert; dieses Enzym reduziert nicht das freie Cytochrom (DIEHL et al., 1970). Das reduzierte Eisen bildet aufgrund seiner sehr großen Affinität

zum Sauerstoff mit diesem schnell einen Oxy-Komplex, der ein weiteres Elektron aufnimmt, wodurch das Sauerstoffmolekül formäl auf die Stufe des Peroxids reduziert wird und dann in der Bindung an das Cytochrom als die eigentliche "aktive" Form des Sauerstoffs gilt. Daraus wird ein Atom in das Substratmolekül eingebaut, während aus dem verbleibenden $1/2 O_2^{--}$ unter Protonenaufnahme Wasser entsteht. Nach dem Ablösen des oxygenierten Substrats vom aktiven Zentrum des Cytochrom P-450 kann das Enzym erneut in den Zyklus eintreten. Das Elektronentransportsystem, das dem Cytochrom P-450 über die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und Cytochrom b_5 Elektronen zuführen kann, wird als Hilfssystem der mikrosomalen Monooxygenasen betrachtet und trägt normalerweise allenfalls zu 10-20 % zur Gesamtreduktion bei (ULLRICH, 1977). Den Phospholipiden scheinen innerhalb des Monooxygenasesystems wichtige Funktionen bei Interaktionen zwischen Cytochrom P-450 und seiner Reduktase sowie zum Erreichen einer aktivierten Konformation des Cytochrom P-450 zuzukommen (RUCKPAUL, 1978).

Monooxygenasen oder "mischfunktionelle Oxidasen", wie sie nach MASON (1957) genannt werden, weil die Einführung eines Atoms des Sauerstoffmoleküls in das Substrat mit der Reduzierung des anderen Sauerstoffatoms zu Wasser einhergeht, finden sich auch in extrahepatischen Organen wie Niere, Lunge, Darm und Haut. Verhältnismäßig hohe Konzentrationen an Komponenten des Monooxygenasesystems liegen in Nebennierenrinde und Gonaden vor, wo neben dem mikrosomalen Cytochrom P-450 noch ein in den Mitochondrien lokalisiertes Monooxygenasesystem existiert, das überwiegend die Steroidbiosynthese durch Hydroxylierungsreaktionen bewerkstelligt (SWEAT et al., 1956; ESTABROOK et al., 1963; HARDING et al., 1964). Weitere physiologische Aufgaben der oxidativen Biotransformationsaktivität bestehen in der ω -Oxidation von Fettsäuren (WADA et al., 1968; DAS et al., 1968) und der Steroidhormoninaktivierung in der Leber (DAS et al., 1968).

Die Affinität von Xenobiotika zum Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasesystem, die sich durch die Dissoziationskonstante K_M des

Enzym-Substrat-Komplexes beschreiben läßt, ist oft kleiner als die der natürlichen Substrate (ACKERMANN, 1978). Exemplarische oxidative Stoffwechselreaktionen von Fremdstoffen sind die Hydroxylierung von Benzol zu Phenol (SCHULTZEN und NAUNYN, 1867), die N-Demethylierung von 4-Dimethylaminoazobenzol - Buttergelb - (MUELLER und MILLER, 1949), die O-Demethylierung von Codein zu Morphin (MANNERING et al., 1954) und die Seitenkettenhydroxylierung von Barbituraten (BRODIE et al., 1955).

Bei Substraten mit aromatischen oder olefinischen Doppelbindungen wird die Cytochrom P-450-vermittelte Sauerstoffanlagerung an das π -Elektronensystem bevorzugt, wobei Epoxide entstehen. An aromatischen Kernen werden diese Oxiranstrukturen auch als Arenoxide bezeichnet. Neben stabilen Epoxiden (DALY, 1971) und sehr instabilen Arenoxiden von einkernigen Aromaten gibt es viele metastabile Epoxide (JERINA und DALY, 1974), die als elektrophil reaktive Verbindungen spontan mit nukleophilen Zellbestandteilen reagieren können, beispielsweise mit Nukleinsäuren und Proteinen. Auf diesen Aspekt wird weiter unten noch näher eingegangen. Zur Inaktivierung der Epoxide tragen außer der spontanen Umlagerung zu Phenolen, die dann in der Phase II-Reaktion konjugiert werden können, vor allem enzymatische Prozesse bei. Neben Glutathion-S-transferasen (FJELLSTEDT et al., 1973) spielen vor allem Epoxidhydratasen eine wichtige Rolle. Diese Enzyme, die in hoher Aktivität in den Lebermikrosomen, in niedrigerer Aktivität auch im endoplasmatischen Retikulum von Niere, Darm und Lunge vorkommen (OESCH et al., 1973), katalysieren die hydrolytische Öffnung des Epoxidrings durch eine trans-Addition von Wasser, wodurch vicinale Diole entstehen. Die Diol-Verbindungen können ihrerseits wieder Substrat für weitere Monooxygenierungen sein.

Induzierbarkeit und differentielle Inhibition

Schon seit längerem ist bekannt, daß die Gabe von Fremdstoffen in vivo mikrosomale Enzymaktivitäten zu erhöhen vermag (BROWN et al., 1954). Diese Befunde gelten nicht nur für das Monooxygenase-

system, sondern auch für die Epoxidhydratase (OESCH et al., 1973). Mittlerweile kennt man mehr als 200 Substanzen, die eine Steigerung der mikrosomalen Oxidationen hervorrufen und selbst als Substrat dienen (nach CONNEY, 1967). Sie lassen sich in zwei Gruppen gliedern, als deren Hauptvertreter bei der einen Klasse Phenobarbital gilt, während bei der anderen Gruppe, die hauptsächlich die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe umfaßt, 3-Methylcholanthren und Benzo(a)pyren hervortreten. Da innerhalb des Monooxygenasesystems eine gute Korrelation zwischen der Beschleunigung des Fremdstoffmetabolismus und dem Anstieg des Cytochrom P-450-Gehalts besteht, wird der Effekt der Substanzen hauptsächlich auf die Induktion des Cytochrom P-450 zurückgeführt (REMMER et al., 1968).

Die Beobachtung, daß das nach Vorbehandlung von Ratten mit Methylcholanthren induzierte Cytochrom P-450 ein charakteristisches spektroskopisches Verhalten zeigt, indem das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes von 450 auf 448 nm verschoben ist (ALVARES et al., 1967), führte im Verlauf weiterer Versuche zu der Erkenntnis, daß durch den polyzyklischen Kohlenwasserstoff eine eigenständige Form des Cytochroms induziert wird, die Cytochrom P₁-450 (SLADEK und MANNERING, 1966) oder Cytochrom P-448 (ALVARES et al., 1967) genannt wird. Dieses Hämprotein zeigt in vitro auch eine andere Substratspezifität als das Cytochrom P-450. Experimentell dient zur Induktion von Cytochrom P-448 statt der sehr potenten Kanzerogene Methylcholanthren bzw. Benzo(a)pyren häufig das β -Naphthoflavin, das ähnliche Induktionseigenschaften wie Methylcholanthren aufweist, aber wahrscheinlich keine kanzerogenen Eigenschaften besitzt (WATTENBERG et al., 1968; BOOBIS et al., 1977). Neben den beiden Cytochromen P-450 im engeren Sinn und P-448 existiert noch eine unbekannte Anzahl weiterer. Bislang konnten in einer Tierspezies (Ratte) wenigstens acht verschiedene Formen von Cytochrom P-450 nachgewiesen werden (GUENGERICH, 1977).

Wegen der geringen Substratspezifität des Monooxygenasesystems der Leber wirkt sich die Induktion durch einen bestimmten Stoff auf den Metabolismus zahlreicher Verbindungen aus. Zur Differen-

zierung der Beteiligung verschiedener Cytochrome am Prozeß der Monooxygenierung kommt dem oxidativen Stoffwechsel von Benzo(a)-pyren besondere Bedeutung zu. Die "Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase" oder "Benzpyrenhydroxylase" wird durch Methylcholanthren weit stärker als durch Phenobarbital induziert (ALVARES et al., 1968). Durch Reinigung von Cytochrom P-450-Formen läßt sich nachweisen, daß die Methylcholanthren-induzierte Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase an Cytochrom P-448 gebunden ist (GUENGERICH, 1977; RYAN et al., 1979). Kreuzungsversuche mit verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen, bei denen die Induzierbarkeit bzw. Nichtinduzierbarkeit der Cytochrom P-448-abhängigen Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase-Aktivität genetisch fixiert ist, zeigen in vivo und in vitro, daß Cytochrom P-448 und die Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase an einen gemeinsamen Genloкус gebunden sind (GIELEN et al., 1972; NEBERT et al., 1973). Eine weitere Zuordnungsmöglichkeit der Enzymaktivitäten zu den induzierten Cytochromen ergibt sich aus dem Einsatz von Antikörpern gegen Cytochrom P-448 und Cytochrom P-450 (THOMAS et al., 1976).

Mit der Induktion durch verschiedene Substrate kann sich auch das Verhalten gegenüber Enzymhemmstoffen ändern. Zur Untersuchung der differentiellen Hemmung verschiedener Cytochrom P-450-Formen bieten sich u.a. Metyrapon und α -Naphthoflavin als Inhibitoren an (GOUJON et al., 1972; WIEBEL et al., 1971; G.F. KAHL et al., 1978). Metyrapon (2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanon), eingeführt als Hemmstoff der 11- β -Hydroxylase bei der Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde (LIDDLE et al., 1958), hemmt beispielsweise die 2- und 4-Hydroxylierung von Biphenyl bei perfundierten Lebern von Ratten, die mit Phenobarbital vorbehandelt sind, nicht jedoch von β -Naphthoflavin-stimulierten Rattenlebern (G.F. KAHL et al., 1978). Auch spektralphotometrisch lassen sich durch Metyrapon Unterschiede zwischen Cytochrom P-450-Formen feststellen. Reduziertes Cytochrom P-450 ergibt mit Metyrapon ein Bindungsspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 446 nm (HILDEBRANDT et al., 1969). Die Induktion mit Phenobarbital er-

hört, die Induktion mit Methylcholanthren erniedrigt die Affinität des Metyrapons für Cytochrom P-450 (JONEN et al., 1974). Zusätzlich wird durch die Stimulation mit Methylcholanthren das Absorptionsmaximum des reduzierten Cytochrom P-450-Metyrapon-Komplexes von 446 nm nach 445 nm verschoben (R. KAHL et al., 1974).

α -Naphthoflavin (α NF) zeigt im Vergleich zum Metyrapon gegensätzliche Eigenschaften, da es vorwiegend mit Cytochrom P-448 reagiert. Nach Vorbehandlung mit β -Naphthoflavin wird die Aktivität der Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase durch α NF ebenso gehemmt (WIEBEL et al., 1971) wie die 2- und 4-Hydroxylierung von Biphenyl, während α NF keinen hemmenden Effekt auf die Hydroxylierungsreaktionen in Phenobarbital-stimulierten Rattenlebern hat (G.F. KAHL et al., 1978). Über die Hemmung der Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase scheint α NF die Kanzerogenität einiger polyzyklischer Kohlenwasserstoffe herabsetzen zu können. So lassen sich Mäuse vor Haut- bzw. Lungenkrebs, der durch 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen hervorgerufen werden kann, durch Applikation von α NF schützen (GELBOIN et al., 1970; KINOSHITA und GELBOIN, 1972). Die durch Benzo(a)pyren ausgelöste Tumorgenese soll dagegen durch α NF nicht gehemmt, sondern eher noch gesteigert werden (KINOSHITA und GELBOIN, 1972a).

Auf die Epoxidhydratase hat α NF keinen Effekt (OESCH et al., 1973), während Metyrapon die Epoxidhydrataseaktivität in vitro, nicht aber in vivo zu steigern vermag (OESCH et al., 1971). Ein spezifischer Inhibitor der Epoxidhydratase ist in vitro das 3,3,3-Trichlorpropylenoxid, das hoch toxische Eigenschaften besitzt und bei noch subletaler Dosierung das Enzym in vivo nicht signifikant hemmen kann (OESCH et al., 1973).

Verbreitung von Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase und von Benzo(a)pyren

Es ist bemerkenswert, daß Aryl-Hydrocarbon-Hydroxylase-Aktivitäten bei den verschiedenartigsten Organismen aufgefunden werden, was

möglicherweise auf eine frühe Entwicklung dieses Enzymsystems im Laufe der Stammesgeschichte hindeutet (vgl. auch WICKRAMASINGHE und VILLEE, 1975). So sind Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenaseaktivitäten nicht nur von landlebenden Wirbeltieren einschließlich der Beuteltiere (McMANUS und ILETT, 1977) bekannt, sondern beispielsweise auch bei Fischen (AHOKAS et al., 1975), Insekten (CAPDEVILA et al., 1973), höheren Pflanzen (MADYASTHA et al., 1976), Pilzen (FERRIS et al., 1976) und Bakterien (KATAGIRI et al., 1968) beschrieben.

Polzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die z.T. kanzerogene Eigenschaften besitzen wie das Benzo(a)pyren, sind selbst ubiquitär verbreitet. Benzpyren wird in der Luft, im Boden und im Wasser gefunden (SCHMÄHL, 1968). Bekannt ist das Vorkommen von Benzpyren in Auto- bzw. Industrieabgasen und im Tabakrauch, dessen Inhalation mit dem Auftreten von Bronchial- und Lungenkrebs gut korreliert (STOCKS, 1970). Bei der Aufnahme mit der Nahrung spielt nicht nur das durch besondere Zubereitungsarten wie Grillen oder Räuchern sich anreichernde Benzpyren eine Rolle, sondern in besonderem Maße auch der verhältnismäßig hohe Benzpyrengehalt pflanzlicher Nahrungsmittel einschließlich der Pflanzenfette und -öle (SCHMIDT und FRITZ, 1968; LINDNER, 1974). Die Pflanzen nehmen Benzpyren, das bei ihnen Wuchsstoffeigenschaften besitzt, aus dem Boden auf, vermögen es aber auch selbst zu synthetisieren (GRÄF und DIEHL, 1966). Ob die über die Nahrungsaufnahme erfolgende Benzpyrenzufuhr, die beim Menschen 3 µg täglich erreichen kann (nach LINDNER, 1974), mit der Entstehung des Magen-Darmkrebses ursächlich zusammenhängt, ist noch unklar (SCHMIDT und FRITZ, 1968).

Chemische Karzinogenese

Bei der Erforschung der chemischen Karzinogenese ist Benzo(a)pyren eine der meistuntersuchten Substanzen. Befunde, die mit subzellulären Fraktionen wie den Mikrosomen in vitro erarbeitet

wurden, führen zu der Annahme, daß ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff als Präkarzinogen erst zum ultimatsten Karzinogen metabolisch aktiviert werden muß, bevor der gebildete reaktive Metabolit durch die kovalente Bindung an Biopolymere wie Nukleinsäuren und Proteine diejenigen zytotoxischen und mutagenen Prozesse auslöst, die schließlich in der Tumorbildung enden (BROOKES und LAWLEY, 1964; GROVER und SIMS, 1968; GELBOIN, 1969; GELBOIN et al., 1969). Als reaktive Zwischenprodukte werden Epoxide (BOYLAND, 1950; GROVER et al., 1971) und Diolepoxide (SIMS et al., 1974) diskutiert, und die Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen sollen zusammen mit den Epoxidhydratassen das Geschehen der chemischen Karzinogenese kontrollieren (OESCH, 1973).

NEMOTO und GELBOIN (1976) berichten vom unterschiedlichen Ausmaß der Glucuronidierung verschiedener reaktiver Benzo(a)pyren-Metaboliten. Da das (-)trans-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyren (7,8-Diol) nur schlecht glucuronidiert wird, ist möglicherweise die erneute Reaktion des 7,8-Diols mit dem Monooxygenasesystem und die Bildung der stark mutagen wirkenden 7,8-Diol-9,10-epoxide begünstigt (WISLOCKI et al., 1976; HUBERMAN et al., 1976; YANG et al., 1977). Diese Diolepoxide des Benzo(a)pyrens werden u.a. kovalent an die DNA von Hamsterembryozellen (BAIRD und DIAMOND, 1977) und an die DNA von menschlichen Bronchialexplantaten (JEFFREY et al., 1977) gebunden.

An Lymphozyten-Kulturen lassen sich Hinweise dafür gewinnen, daß das Auftreten von Bronchialkarzinomen beim Menschen mit der Induzierbarkeit der Cytochrom P-448-bedingten Monooxygenaseaktivität zusammenhängt (KELLERMANN et al., 1973). Nach Induktion der Monooxygenaseaktivität steigt in vitro die kovalente Bindung von Metaboliten polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (GELBOIN, 1969; PEZZUTO et al., 1976; JERNSTRÖM et al., 1976) ebenso wie die Zelltransformationsaktivität in Zellkulturen (MARQUARDT und HEIDELBERGER, 1972) an. Dennoch ist die postulierte Korrelation zwischen der Induktion der Monooxygenase und der Onkogenese unter in vivo-Verhältnissen für Benzo(a)pyren bestritten worden (WATTENBERG, 1972;

BENEDICT et al., 1973). Eine mögliche Erklärung für die kontroversen Ansichten über die Bedeutung des Cytochrom P-448 für die Krebsentstehung könnte sich aus der näheren Analyse der Entgiftungskapazität intakter Zellen und Organe ergeben, die sich auch in veränderten Benzpyrenmetabolit-Profilen widerspiegelt. Bei Inkubationen in vitro mit Benzo(a)pyren in Anwesenheit von Mikrosomen werden verschiedene kovalent an Nukleinsäuren gebundene Metaboliten nachgewiesen (KING et al., 1975; PELKONEN et al., 1978), während bei intakten Zellmodellen wie Mausembryozellen (BAIRD et al., 1975), menschlichen Bronchialexplantaten (JEFFREY et al., 1977) und Maushaut (DAUDEL et al., 1975) vor allem die 7,8-Diol-9,10-epoxide des Benzo(a)pyrens aufgefunden werden.

Die Leber besitzt zwar das größte Metabolisierungspotential aller Organe für Benzo(a)pyren, ist aber selbst nicht anfällig für Benzpyren-induzierte Tumoren. Als Zielorgane für durch Benzpyren ausgelösten Krebs gelten Lunge (COHEN und MOORE, 1976), Haut (SLAGA et al., 1978) und eventuell Pankreas (IQBAL et al., 1979). Es ist denkbar, daß in vivo eine erhebliche Anzahl der von der Leber gebildeten reaktiven Benzpyrenmetaboliten die genannten Zielorgane erreichen, dort kovalent an zelluläre Makromoleküle binden und damit krebsauslösend wirken können.

Als Werkzeug für Untersuchungen zu den angeschnittenen Fragen, vor allem zur Validierung in vitro gewonnener Erkenntnisse unter angenäherten in vivo-Bedingungen, bietet sich das semi-in-vivo-Modell isoliert perfundierter Organe an (vgl. ROSS, 1972). Bei diesem System bleiben die Membranstrukturen erhalten, und durch die weitgehende Bewahrung der Zellintegrität läßt sich die Abhängigkeit der Stoffwechselreaktionen untersuchter Fremdstoffe von der Stoffwechsellage der Zelle erfassen. Ein weiterer Vorteil, auch gegenüber dem Ganztier, liegt darin, daß durch Variation von Art und Konzentration der zum Perfusionsmedium zugefügten Substanzen bzw. durch den Austausch des Perfusionsmediums gezielte Fragestellungen ermöglicht werden und die Interdependenz zweier Organe untersucht werden kann.

II. Ziel der Arbeit

Ausgangspunkt der Arbeit ist der Befund, daß zumindest unter in vitro-Bedingungen nach Induktion des Monooxygenasesystems vermehrt metabolisch aktiviertes Benzo(a)pyren an zelluläre Biopolymere gebunden wird (JERNSTRÖM et al., 1976; PEZZUTO et al., 1976). Um die Bedeutung für die Verhältnisse in vivo abschätzen zu können, sollen Versuche auf der Ebene weitgehend intakter Organe durchgeführt werden.

1. Zunächst wird der Einfluß verschiedener Induktoren von Cytochromen P-450 auf die Bindung von Benzo(a)pyrenmetaboliten an zelluläre Makromoleküle eines verhältnismäßig leicht zugänglichen Überlebenden Organs, der isoliert perfundierten Rattenleber, untersucht. Anschließend soll an diesem Modell geprüft werden, inwieweit Inhibitoren der Monooxygenase und der Epoxidhydratase das Ausmaß der irreversiblen Bindung modifizieren.
2. Es wird der Frage nachgegangen, ob die Menge der durch die Galle ausgeschiedenen Benzpyrenäquivalente vom Induktionszustand der Leber abhängig ist.
3. Durch die Analyse der Nukleosidaddukte von Benzpyrenmetaboliten, die aus den DNA- und RNA-Fractionen von perfundierten Lebern unterschiedlich vorbehandelter Tiere gewonnen werden, soll die Beteiligung einzelner Metaboliten an der irreversiblen Bindung unter den jeweiligen Bedingungen abgeschätzt werden.
4. Weitere Versuche befassen sich mit Zeitverlaufsstudien, um die Kinetik der Bindung von Benzpyrenmetaboliten an DNA, RNA und Protein näher kennenzulernen. Es soll zusätzlich geprüft werden, ob eine zeitabhängige Verschiebung der Metabolit-Profile auftritt.

5. Da sich die Lunge von der Leber auch in solchen Eigenschaften wie Induzierbarkeit der Monooxygenasen, Entgiftungskapazität durch konjugierende Reaktionen u.a.m. unterscheidet, sollen Ausmaß und Art der irreversiblen Bindung von Benzpyrenmetaboliten an Nukleinsäuren und Protein isoliert perfundierter Lungen unterschiedlich vorbehandelter Ratten ermittelt werden.
6. Zur Überprüfung der Möglichkeit, daß von der Leber gebildete Benzpyrenmetabolite auf systemischem Wege in die Lunge geraten und erst dort irreversibel binden, werden Versuche im kombinierten Perfusionssystem Rattenleber-Rattenlunge durchgeführt.
7. Die Untersuchungen sollen abgerundet werden durch Experimente an einer weiteren Tierspezies, wobei Inzucht-Mäusestämme mit genetisch unterschiedlich fixierter Induzierbarkeit von Cytochrom P-448 Verwendung finden. Es wird der Frage nachgegangen, ob die Ergebnisse von Mäuseleberperfusionen, Mäuselungen-Schnitten und Mäuselungenperfusionen den an Ratten gewonnenen Resultaten vergleichbar sind.

III. Material und Methoden

1. Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere dienten adulte männliche Sprague-Dawley-Ratten^{a)} mit einem Gewicht von 240-300 g und adulte männliche Mäuse der Stämme C57BL/6N und DBA/2N^{b)} mit einem Gewicht von 15-25 g. Die konventionell gehaltenen Tiere erhielten Mischfutter-Pellets^{c)} und Wasser ad libitum.

2. Vorbehandlung der Versuchstiere

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Injektion von β -Naphthoflavon oder Phenobarbital vorbehandelt. Die Dosierung von β -Naphthoflavon, das 48 Stunden vor Versuchsbeginn appliziert wurde, betrug 80 mg/kg Körpergewicht (KG), suspendiert in 4 ml Erdnußöl/kg KG. Phenobarbital wurde in 3 Dosen von je 80 mg/kg Körpergewicht in 3,33 ml physiologischer Kochsalzlösung/kg KG in 24-Stunden-Intervallen gegeben; die letzte Injektion erfolgte 24 Stunden vor Versuchsbeginn.

Den Mäusestämmen wurde als Cytochrom P-448-Induktor Methylcholanthren statt β -Naphthoflavon in der Dosierung von 80 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 10 ml Maisöl/kg KG, zweimal innerhalb von 5-6 Tagen vor Versuchsbeginn verabreicht.

Kontrolltiere erhielten zu den angegebenen Zeitpunkten gleiche Volumina Öl bzw. Kochsalzlösung.

3. Perfusionstechniken

3.1. Apparatur

Die verwendete Vorrichtung zur rezirkulierenden Perfusion von Organen war in Anlehnung an MILLER et al. (1951) aufgebaut,

a) Versuchstier-Zuchtanstalt Wiga, Sulzfeld

b) Small Animal Section, NIH, Bethesda, Maryland, USA

c) Standard-Diät der Fa. Altromin, Lage/Lippe

wobei einige von HEMS et al. (1966) angegebene Modifikationen berücksichtigt wurden, wie z.B. die Verwendung einer Rollenspumpe und das Belassen des Organs in situ.

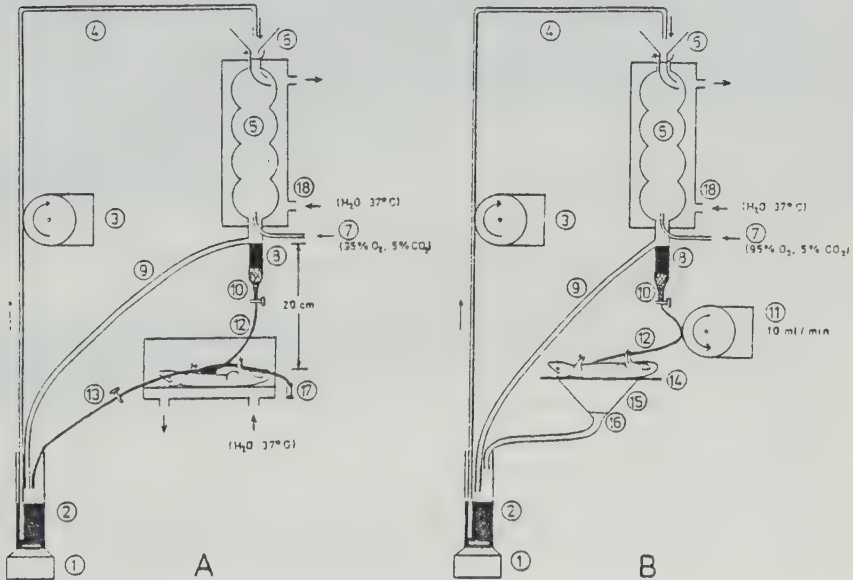


Abbildung 1. Apparatur zur Perfusion von isolierten Lebern (A) oder isolierten Lungen (B)

Wie Abbildung 1 zeigt, wird das Perfusionsmedium von einem Magnetrührer (1) im Vorratsgefäß (2) durchmischt und von einer Schlauchpumpe (3) durch ein Glasrohr (4) in den Oxygenator (5) befördert. Zur gleichmäßigen Benetzung der Oxygenatorwand ist ein langsam rotierender Einlaßstutzen (6) vorgeschaltet. Der Flüssigkeitsfilm wird im Gegenstrom mit angefeuchtetem Carbogen (95 Vol.% O₂, 5 Vol.% CO₂) begast (7). Nach der Oxygenatorpassage fließt das Perfusionsmedium in ein Überlaufgefäß, dessen

Pegel (8) bei Rattenleberperfusionen 20 cm über dem Organ liegt. Der Überlauf (9) führt in das Reservoir zurück. Das durch einen Filter aus Glaswolle (10) strömende Perfusionsmedium wird entweder druckkonstant (Leberperfusionen; Abb. 1 A) oder mittels einer dazwischengeschalteten Rollenpumpe (11) volumenkonstant (10 ml/min bei Lungenperfusionen; Abb. 1 B) in die in situ belassenen Organe geleitet (12). Nach der Organpassage fließt bei Leberperfusionen das Perfusat direkt aus dem vena-cava-Katheter (13) in das Vorratsgefäß zurück. Bei Lungenperfusionen liegt das Tier auf einem Netz (14) über einem Trichter (15), von dem das durch ein feinmaschiges Sieb (16) herabtropfende Perfusat zurückgeleitet wird. Gallensekret wird durch einen Katheter in ein Sammelgefäß (17) abgeleitet. Ein Warmwassermantel (18) hält die Temperatur des Oxygenators auf 37° C.

3.2. Perfusionsmedium

Zur Perfusion wurde eine Modifikation des von SCHIMASSEK (1962) angegebenen halbsynthetischen Mediums verwendet. Das pro Versuch eingesetzte Volumen von 50 ml bestand aus 30 ml einer Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung mit einem pH-Wert von 7,6 und aus 20 ml gewaschenen Ochsenerythrozyten. Diese Suspension enthielt noch 0,75 g Rinderserumalbumin als kolloidosmotischen Anteil und 50 mg Glucose. Bei Begasung mit Carbogen stellte sich der pH-Wert des Perfusionsmediums auf 7,4 ein. Der Hämatokrit betrug im Mittel 34 Vol.%.

Das vom Schlachthof bezogene Ochsenblut wurde beim Schlachten im Verhältnis 1:1 in einer kalten Citratlösung aufgefangen, die aus 51,25 g Glucose, 19,68 g Trinatriumcitrat·2 H₂O, 1,375 g Citronensäure und 10,4 g NaCl ad 2,5 l aqua bidest. bestand. Das bei 4° C aufbewahrte Citratblut wurde nicht länger als 4 Tage verwendet. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert, zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung und schließlich mit Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung gewaschen.

3.3. Präparation

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Urethan (1,2 g/kg Körpergewicht als 20%ige Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung) bei Ratten und von Pentobarbital-Natrium^{a)} (150 mg/kg KG) bei Mäusen. In Narkose wurde ihnen 10 mg/kg KG Heparin^{b)} als 0,4%ige Lösung in 0,9%iger NaCl-Lösung intravenös verabreicht. Während der Präparation lagen die Tiere auf Eis, um durch Senkung der Körpertemperatur eine eventuelle Beeinträchtigung der Organfunktion durch die Anoxie möglichst gering zu halten.

3.3.1. Operationstechnik bei Rattenleberperfusion

Der Bauchsitus wurde durch Längs- und Querschnitte freigelegt und das Pfortadergebiet durch Verlagerung des Darmkonvoluts auf die linke Seite des Tiers dargestellt. Der Gallengang wurde durch eine duodenumnahe Ligatur gestaut, nahe dem Leberhilus angeschlungen und dazwischen inzidiert. Ein Polyvinylchlorid-Katheter (lichte Weite 0,5 mm, Außendurchmesser 0,95 mm) wurde durch die Öffnung eingeschoben und durch Zuziehen und Knoten der proximalen Schlinge fixiert. Anschließend erfolgte lockeres Anschlingen der Pfortader proximal und distal, der arteria hepatica und der vena cava inferior abdominalis oberhalb des Abgangs beider Nierenvenen. Danach wurde die hilusferne Schlinge um die Pfortader gezogen und ein mit kalter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung gefüllter PVC-Katheter (1,5 mm x 2,1 mm) in der gleichen Weise wie beim Gallengang fixiert. Vom Zeitpunkt der Pfortaderunterbindung an galt die Leber als anoxisch. Die restlichen Ligaturen wurden ebenfalls gezogen und geknotet. Nun wurde die Brusthöhle eröffnet, die vena cava inferior thoracis zwischen rechtem Vorhof und Zwerchfell angeschlungen und durch einen Schnitt in den rechten Vorhof ein weiterer Katheter (1,5 mm x

a) Nembutal^{R)}, Abbott, Ingelheim

b) Vetren^{R)}, Promonta, Hamburg

2,1 mm) bis kurz vor das Zwerchfell eingeschoben und fixiert. Die Leber wurde anschließend über den Pfortaderkatheter mit kalter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung durchspült, bis sie eine hellbraune Farbe angenommen hatte, und dann mit den Kathetern in Pfortader und vena cava an die Perfusionsapparatur angeschlossen, womit die Anoxiezeit endete.

Die Gesamtpräparationszeit betrug etwa 15 Minuten, davon entfielen bei der angegebenen strengen Definition der Anoxiezeit durchschnittlich 6,9 Minuten auf die Leberanoxie. Bei dieser relativ langen Anoxiezeit ist zu berücksichtigen, daß durch die Spülung des Organs mit eiskalter Pufferlösung eine schnelle Abkühlung erfolgt.

3.3.2. Operationstechnik bei Rattenlungenperfusion

Die Brusthöhle der Ratte wurde - bei gleichzeitiger Zeitnahme zur Registrierung der Anoxiezeit - durch Längs- und Querschnitte freigelegt, das Pericard und der Thymus weitgehend abpräpariert und die vena cava inferior thoracis zwischen rechtem Vorhof und Zwerchfell locker angeschlungen. Weitere Schlingen wurden um vena cava superior und arteria pulmonalis jeweils herznah gelegt. Anschließend erfolgte ein V-förmiger Einschnitt in den Truncus pulmonalis, durch den ein PVC-Katheter (1,5 mm x 2,1 mm) bis zur Aufzweigung der Pulmonalarterie vorgeschoben und durch Zuziehen und Knoten der vorbereiteten Schlinge fixiert wurde. Nach dem Zuziehen der restlichen Ligaturen wurde der linke Ventrikel eingeschnitten und die Herzspitze abgetrennt. Die Lunge konnte nun über den Katheter mit kalter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung durchspült werden, bis sie eine weiße Farbe angenommen hatte. Danach wurde sie an die Perfusionsapparatur angeschlossen, wobei das aus dem linken Ventrikel abfließende Perfusat in einem Trichter gesammelt und in das Vorratsgefäß zurückgeleitet wurde. Die Präparations- bzw. Anoxiezeit betrug durchschnittlich 10,4 Minuten.

Bei den Experimenten mit vorangeschalteter Leber erschien es sinnvoll, die Lunge während der Perfusion zu ventilieren, da das aus der Leber herausfließende Perfusat verhältnismäßig sauerstoff-

arm war. Bei diesen Versuchsversuchen wurde daher zu Beginn der Operation eine Tracheotomie ausgeführt und ein PVC-Katheter (1,5 mm x 2,1 mm) in die Trachea eingebunden, durch die die Lunge mittels einer Starling-Pumpe mit 15 x 1,2 ml Luft pro Minute versorgt wurde.

3.3.3. Operationstechnik bei Mäuseleberperfusion

Die Lebern von Mäusen wurden unter Verwendung eines Stereomikroskops mit der bei Rattenlebern beschriebenen Technik präpariert, wobei PVC-Kanülen mit den Maßen 0,5 mm x 0,95 mm in Pfortader und vena cava inferior thoracis eingebunden wurden. Die Gallenblase wurde lediglich angeschnitten. Die halbstündigen Perfusionen geschahen volumenkonstant mit 1,3-1,6 ml/min.

3.4. Durchführung der Perfusionsversuche

Nach dem Anschließen der in situ belassenen Organe an die Perfusionsapparatur und dem Abdecken der Organe mit Klarsichtfolie zum Schutz vor Austrocknung der Oberfläche wurde ca. 20 Minuten mit dem Perfusionsmedium vorperfundiert, bis das Organ eine Temperatur von 33-35° C angenommen hatte. Bei Rattenleberperfusionen sollte dann das Durchflußvolumen mindestens 12 ml/min betragen und kein auffälliges Lecken des Organs aufgetreten sein. Bei Experimenten zur Untersuchung der Wirkung von Monooxygenase- bzw. Epoxidhydratase-Inhibitoren wurden anschließend entweder 1,36 mg α -Naphthoflavon in 0,1 ml Dimethylformamid oder 1,13 mg Metyrapon in 1 ml Puffer oder 100 μ l einer 3,3,3-Trichlorpropylenoxid-Lösung (10 μ l TCPO ad 366 μ l Dimethylformamid) dem Perfusionsmedium zugefügt, um Konzentrationen von 0,1 mM, 0,1 mM und 0,5 mM zu erhalten. In Kontrollversuchen wurden gleiche Volumina der Lösungsmittel eingesetzt. Mit diesen Zusätzen wurde weitere 5 Minuten vorperfundiert.

Tritiummarkiertes Benzo(a)pyren (BP) wurde im dann abgedunkelten Perfusionslabor je nach Experiment in 0,3 - 0,6 ml Äthanol zugegeben zu einer Endkonzentration von 1 - 100 μ M im Perfusionsmedium. Die eingesetzte Radioaktivität betrug 40 μ Ci - 8,3 mCi. Zum

Zeitpunkt der BP-Zugabe wurde bei Rattenleberperfusionen das Gallensekret-Sammelgefäß ausgetauscht. Während der bis zu 2 Stunden nach BP-Zusatz fortgeführten Perfusion wurden periodisch der Spiegel im Perfusat-Sammelgefäß, die Temperatur des durchströmten Organs und das Durchflußminutenvolumen kontrolliert. Bei einigen Versuchen wurden in Zeitintervallen Aliquote von Restperfusat und Galle entnommen. Nach beendeter Perfusion wurde das Organ mit kalter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung durchspült, nach dem Herausschneiden gewogen zur Bestimmung des Feuchtgewichts und schließlich bei -20°C eingefroren. Restperfusat und Gallensekret wurden nach Messung der Volumina ebenfalls tiefgefroren. Aliquote von Organgewebe (10 - 20 mg, über Nacht versetzt mit 0,5 ml Gewebsauflöser; s. 5.2.), Gallensekret (10 μl) und Restperfusat (10 μl , versetzt mit 20 μl 30%iger H_2O_2 -Lsg.) wurden vorher entnommen und ihre Radioaktivität gemessen.

3.5. Sauerstoffmessungen

Zur Kontrolle ausreichenden Sauerstoffangebots im Perfusionsmedium und zur Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs des isoliert perfundierten Organs wurde in einem orientierenden Versuch an einer Rattenleber der Sauerstoffgehalt im Medium bestimmt. Die O_2 -Mengen in gleichzeitig entnommenen arteriellen und venösen Proben von je 20 μl wurden photometrisch in O_2 -Küvetten^{a)} nach ZANDER et al. (1977) nachgewiesen, wobei der Sauerstoff quantitativ mit einer spezifischen Reaktionsflüssigkeit (alkalische Lösung von Brenzkatechin in Verbindung mit zweiwertigen Eisenionen) reagiert und dadurch eine Farbänderung hervorruft. Wegen der Eigenfarbe des Mediums mußte ein Leerwert berücksichtigt werden. Dazu wurde das gleiche Probenvolumen in eine zweite

a) Herrn Prof. Dr. R. Zander, Physiologisches Institut der Universität Mainz, danke ich für die großzügige Überlassung der O_2 -Einmalküvetten

Küvette eingegeben, die anstelle der Reaktionsflüssigkeit eine alkalische Natrium-Dithionit-Lösung enthält. Diese Lösung ist auch im Beisein von Sauerstoff ungefärbt, so daß eine Extinktionsänderung allein auf Blutfarbstoffe zurückzuführen ist.

Bestimmungen innerhalb eines Perfusionszeitraums von 2 Stunden ergaben einen mittleren Verbrauch von $2,63 \mu\text{mol O}_2$ pro Minute und Gramm Leberfeuchtgewicht (Standardabweichung $s=0,18$; $n=7$). Das ist mit aus der Literatur entnommenen Werten von ca. $2,5 \mu\text{mol O}_2$ pro Minute und Gramm Leberfeuchtgewicht vergleichbar (SCHIMASSEK, 1962). Durch den Zusatz von $2 \times 300 \mu\text{l}$ Äthanol nach ca. 70- und 100-minütiger Perfusion trat keine beobachtbare Veränderung der Leberatmung auf.

4. Inkubation von Lungen-Schnitten

Vorbehandelte Mäuse wurden durch Überstrecken der Halswirbelsäule getötet und durch Eröffnen der Halsgefäße gut ausgeblutet. Pro Versuchsgruppe wurden die Lungen von 10 - 30 Tieren ($0,6 - 2,0 \text{ g}$ Gewebe) in 10 ml kalter Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung mit Scheren zerkleinert. Die erhaltenen Partikeln sollten einen maximalen Durchmesser von 1 mm nicht überschreiten. Die Gewebestückchen wurden mit weiteren 10 ml Puffer, die $0,4 \text{ g}$ Rinderserumalbumin enthielten, in lichtgeschützte Erlenmeyerkolben umgefüllt und unter kontinuierlicher Begasung mit $5\% \text{ CO}_2$ in O_2 für 15 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Tritiummarkiertes Benzo(a)pyren wurde dann in $150 \mu\text{l}$ Äthanol zugegeben zu einer Endkonzentration von $6,25 \mu\text{M}$, wobei die eingesetzte Radioaktivität 5 mCi betrug. Nach einer Inkubationsdauer von 120 Minuten wurden die Gewebestückchen abzentrifugiert, in Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei -20° C eingefroren.

5. Isotopen-Techniken

5.1. Verwendeter Tracer

An radioaktivem Material fand in Benzol gelöstes ^3H -Benzo(a)-pyren der Fa. Amersham Buchler (Braunschweig) Verwendung. Die spezifische Aktivität betrug 8,3 - 56 Ci/mmol entsprechend 33 - 222 mCi/mg. Bei Bedarf wurde unmarkiertes Benzo(a)pyren zugesetzt, das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand in n-Hexan gelöst. Drei Waschgänge mit 0,25 N NaOH in 40%igem Äthanol schlossen sich an. Nach Evaporierung der Hexanphase wurde der Benzpyren-Rückstand in absolutem Äthanol aufgenommen. Im Mittel ergab sich durch das Waschen ein Verlust von 29 % der eingesetzten Radioaktivität.

Dünnschichtchromatographische Reinheitsüberprüfungen des Benzpyrens erfolgten auf Kieselgelplatten^{a)} mit einem Laufmittelgemisch von 90 Vol.% Benzol und 10 Vol.% Äthanol.

5.2. Radioaktivitätsmessungen

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die überwiegend wasserhaltigen Proben mit Scintillator^{b)} versetzt und im Flüssigkeitszintillationszähler^{c)} (^3H -Zählausbeute: 38 %) gemessen.

Chemolumineszenz war entweder nicht nachweisbar oder lag im provoziert ungünstigsten Fall (Zusatz von Gewebsauflöser^{d)} oder H_2O_2) unter 1 % der Zählausbeute, die von der tatsächlich im Gewebe oder Perfusat vorhandenen Radioaktivität herrührte und wurde daher als vernachlässigbar angesehen.

a) 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt

b) ACS (Aqueous Counting Scintillant), Amersham/Searle, Heusenstamm

c) Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Model 3380, Packard Instrument Company, Frankfurt am Main

d) Tissusol-Roth^{R)}, Carl Roth KG, Karlsruhe

Die Quenchkorrektur der Meßproben erfolgte nach automatischer externer Standard-Kanalverhältnisbildung durch Anwendung von Korrekturfaktoren.

Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität wurde Homogenaten von Rattenlebern und Rattenlungen, die lediglich blutfrei gespült worden waren, tritiummarkiertes Benzo(a)pyren in einer Konzentration und einer spezifischen Aktivität zugesetzt, die in der Größenordnung der einer Perfusion unterworfenen Organe lagen. Nach 60-minütigem Stehenlassen bei 0 - 4° C wurden diese Homogenate in der gleichen Weise aufgearbeitet wie die Homogenate von perfundierten Organen. In anderen Experimenten wurde die Perfusion von Rattenlebern nach der üblichen Vorperfusionsdauer beendet, bevor tritiummarkiertes Benzpyren zugesetzt war.

5.3. Bilanz-Berechnungen

Die Summe der Impulsraten von Restperfusat und Organgewebe (und Gallensekret bei Leberperfusionen) ergab im Mittel einen Wiederfund von ca. 78 % der effektiv eingesetzten Radioaktivität. Die Verteilung der im Organgewebe enthaltenen freien und gebundenen Aktivität wurde in einigen Fällen beim Aufarbeiten durch Erstellen von Auswaschkurven weiterverfolgt.

6. Aufarbeitung der Organe

6.1. Isolierung von DNA, RNA und Protein

Zur Darstellung der zellulären Makromoleküle fand im wesentlichen die Methode von DIAMOND et al. (1967) in der Modifikation von KUROKI und HEIDELBERGER (1971) Verwendung. Ca. 3 g Lebergewebe oder die ganze Lunge (durchschnittliches Feuchtgewicht: 1,7 g) wurden in 30 bzw. 20 ml Kirby's Extraktionsmedium^{a)} (KIRBY und COOK, 1967) homogenisiert und anschließend

a) 1 g Na-Triisopropyl-naphthalinsulfonat, 6 ml Butan-2-ol, 100 ml H₂O, 6 g Na-4-Aminosalicylat, 1 g NaCl

mit dem gleichen Volumen Phenol/m-Kresol/8-OH-Chinolin/Wasser (100 g/14 ml/100 mg/11 ml) extrahiert. Nach zweifacher Zentrifugation bei 12000g und bei 17000g wurde die DNA aus der oberen wäßrigen Phase mit Äthylglykol ausgefällt, mit einem Glasstab herausgehoben und in Sørensen-Phosphatpuffer pH 6,0 gelöst. Verunreinigungen mit RNA wurden durch Inkubation (30', 37° C) mit RNase^{a)}, Protein-Verunreinigungen durch viermaliges Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Danach erfolgte erneutes Ausfällen der DNA mit 2 % Natriumacetat in 70%igem Äthanol und Waschen in Äthanol sowie schließlich in Diäthyläther. Nach dem Trocknen wurde die DNA in einer Citratlösung (pH 6,0) aufgenommen, die 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat enthielt.

Die Isolierung der RNA geschah aus der wäßrigen Phase nach dem Entfernen der DNA durch Hinzufügen des doppelten Volumens Äthanol und Stehenlassen über Nacht bei 4° C. Nach Zentrifugation wurde das Präcipitat in einer Citratlösung (pH 6,0) aufgelöst, die zusätzlich 5 µg/ml Kalium-Polyvinylsulfat als RNase-Inhibitor enthielt, und nach der Zugabe des doppelten Volumens Äthanol über Nacht bei -20° C stehen gelassen. Zur besseren Deproteinisierung wurde der letzte Schritt bei den meisten Versuchen noch mindestens zweimal wiederholt, bevor die RNA in der Polyvinylsulfat enthaltenden Citratlösung weiter analysiert wurde. In einigen Fällen wurde statt dessen mit 10%iger Trichloressigsäure ausgefällt, auf 90° C für 15 Minuten erhitzt und nach Zentrifugation der Überstand für Bindungs-Bestimmungen verwendet.

Protein wurde aus der phenolischen Phase einschließlich der Zwischenschicht mit Methanol im Überschuß ausgefällt und nach Zentrifugation fünfmal mit Methanol und einmal mit Diäthyläther gewaschen. Nach dem Trocknen erfolgte das Auflösen des Proteins

-
- a) RNase wurde zuvor zur Unterdrückung von DNase-Aktivität in einer Acetatlösung (pH 5,0; 0,1 M NaCl und 0,01 M Natriumacetat) 10 Minuten lang erhitzt

in 1 N NaOH bei 37° C über Nacht zu einer Endkonzentration von ca. 1,5 mg/ml.

Die in den Waschflüssigkeiten gemessene Radioaktivität fiel zunächst exponentiell ab und näherte sich bei den letzten Waschgängen asymptotisch einem konstanten Wert, der nur gering über dem Leerwert lag.

Der Proteingehalt in den Nukleinsäurefraktionen wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) bestimmt. Die DNA erwies sich als fast proteinfrei (Anteil <1 %), während die RNA-Fraktion auch bei Anwendung von Trichloressigsäure noch einen Proteinanteil enthielt, der dem RNA-Gehalt gleichkam. Eine Behandlung mit Natriumdodecylsulfat oder mit Proteinase K konnte den Proteingehalt ebenfalls nicht ausreichend senken. Erst die zweimalige Wiederholung der Ausfällung mit Äthanol bei -20° C erniedrigte den Proteingehalt auf < 20 %, bei öfterer Wiederholung sogar auf 0 %.

6.2. Bestimmung der Makromoleküle und der irreversiblen Bindung

Der Gehalt an Nukleinsäuren wurde bei DNA-Lösungen mit Hilfe der Diphenylamin-Reaktion (BURTON, 1968), bei RNA-Lösungen mittels der Orcinol-Reaktion (SCHNEIDER, 1957) bestimmt. Als Standard dienten Kalbsthymus-DNA und Hefe-RNA.

Die Messung des Proteingehalts in Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951) mit Lab-Trol^R)^{a)} als Standard.

Zur Radioaktivitätsmessung wurden Aliquote der RNA- und der Proteinlösungen direkt dem Szintillator zugesetzt. Bei DNA-Lösungen wurden Aliquote erst mit DNase I vorbehandelt (37° C, 30'), bevor sie mit dem Szintillator vermischt und gezählt wurden.

Der als Quotient zwischen der Impulsrate der Lösungen (DPM/ml) und deren Makromolekülgehalt (mg/ml) ermittelte Wert (DPM/mg) diente nach Umrechnung auf pmol Benzo(a)pyren-Äquivalente pro mg Makromolekül als Maß für die irreversible Bindung.

a) Merz und Dade GmbH, München

6.3. Herstellung und Untersuchung der Mikrosomenfraktion

Von einigen mit $\sim 100 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundierten Rattenlebern wurden Mikrosomensuspensionen hergestellt. Die Aufbereitung geschah nach Wegnahme eines Leberaliquots zur Isolierung der Makromoleküle aus der verbleibenden Restleber nach der von GIELEN et al. (1972) beschriebenen Methode unter Anwendung von Ultrazentrifugationstechniken^{a)}.

Die Untersuchung der Hämoproteine erfolgte an einem Doppelwellenlängen-Spektralphotometer^{b)}. Der Cytochrom P-450-Gehalt, die Lage des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-Komplexes und der Cytochrom b_5 -Gehalt wurden nach OMURA und SATO (1964) und RAW und MAHLER (1959) bestimmt.

7. Auftrennung von Benzo(a)pyren-Metabolit-Nukleosid-Addukten

Die annähernde Identifikation der an Nukleinsäuren kovalent gebundenen Benzo(a)pyren-Metaboliten erfolgte mit Nukleinsäure-Hydrolyse und Gelfiltrationsmethoden, die von PELKONEN et al. (1978) und BOOBSIS et al. (1978) in Anlehnung an BAIRD und BROOKES (1973) beschrieben wurden.

Die Nukleinsäuren wurden aus einzelnen perfundierten Mäuselebern, aus inkubierten Lungen-Schnitten von 10 - 30 Mäusen, aus 1 - 3 perfundierten Rattenlebern (6 - 27 mg DNA, 9 - 59 mg RNA) und aus 8 perfundierten Rattenlungen (15 mg DNA, 6 mg RNA) isoliert.

7.1. Hydrolyse der Nukleinsäuren

Das Nukleinsäurematerial wurde gelöst in 10 ml 0,01 M Trispuffer pH 7,0, der 0,01 M MgCl_2 enthielt, und anschließend bei 37°C 6 Stunden mit ca. 280 Kunitz Einheiten DNase I bzw. mit ca. 11

a) Beckman^{R)}-Ultrazentrifuge Typ L2 65B, Beckman Instruments GmbH, München

b) Aminco-Chance, American Instruments Co., Silver Spring, Maryland, USA

Kunitz Einheiten RNase inkubiert. Nach dem Zusatz von 1 ml 0,1 M Trispuffer pH 9,0 und 0,1 Einheiten Venom Phosphodiesterase folgten ca. 48 weitere Inkubationsstunden. Zuletzt wurden 2,5 Einheiten alkalische Phosphatase zugegeben und die enzymatische Hydrolyse ca. 24 Stunden fortgesetzt, worauf die Proben bei -20°C bis zur Chromatographie eingefroren wurden.

7.2. Säulenchromatographische Techniken

7.2.1. Chromatographie-Säule und Fraktionssammler

Die Trennsäule bestand aus einer Glassäule^{a)} 1,5 cm (innerer Durchmesser) x 90 cm (Länge), die mit Sephadex LH-20^{a)} gefüllt war. Zur Füllung wurden 50 g Sephadex LH-20 in ca. 300 ml Methanol über Nacht gequollen, durch Anlegen eines Vakuums entlüftet und zweimal zum Entfernen "feiner" Bestandteile mit Methanol gewaschen. Nach dem dritten Entlüften des Gels und Dekantieren des Methanols erfolgte das Vollfüllen der Säule, durch die dann mit einer Schlauchpumpe^{b)} 400 - 500 ml 90 Vol.-%iges Methanol in Wasser (1 ml/min) gedrückt wurde. Anschließend wurde mit ca. 500 ml 30 Vol.-%igem Methanol in Wasser äquilibriert, wobei sich die Gelpackung auf eine Höhe von ungefähr 80 cm kontrahierte. Zum Schutz der Gel-Oberfläche wurde ein Scheibchen aus Filterpapier aufgelegt.

Das Auffangen eluierter Fraktionen geschah mit einem LKB-Fraktionssammler^{c)} für 200 Auffanggefäße, der so eingestellt war, daß alle 5 Minuten ein Fraktionswechsel stattfand.

a) Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg

b) Desaga GmbH, Heidelberg

c) LKB Ultrarac Fraktionssammler Typ 7000; Uvicord II Ultraviolett Absorptiometer Detektor Typ 8303A, Kontroll Einheit Typ 8301A; Fallbügelschreiber Typ 6520H. LKB-Produkte AB, Stockholm, Schweden

7.2.2. Auftragen der Probe und Chromatographie

Die hydrolysierte Nukleinsäureprobe wurde aufgetaut, gefriergetrocknet, in 4,4 ml 30%igem Methanol aufgelöst und gefiltert. Nach Abnahme von zwei 50 µl-Aliquoten zur Radioaktivitätsmessung wurden dem Filtrat 0,1 ml UV-Marker-Lösung (5 mg/ml 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridin in Methanol) zugesetzt, die Probe mit Luft in das Gel eingedrückt und die Säule mit 30%igem Methanol aufgefüllt. Die Elution der Addukte geschah durch das Anlegen eines von 30 % Methanol in Wasser zu 100 % Methanol ansteigenden Gradienten (500 ml 30%iges, 800 ml reines Methanol) mit einem durchschnittlichen Elutionsvolumen von 5,1 ml pro 5 Minuten und Fraktion.

Nach dem Sammeln von 200 Fraktionen wurde die Trennsäule, die mehrfach verwendet werden konnte, durch das Spülen mit mindestens 400 ml 30%igem Methanol gewaschen.

7.2.3. Identifikation der Addukte

Von jeder zweiten Fraktion wurde ein 1 ml-Aliquot im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen. Die erhaltenen Impulsraten wurden in pmol Benzo(a)pyren-Äquivalente umgerechnet und gegen die Fraktionsnummer aufgezeichnet. Die übersprungenen Fraktionen standen zur gelegentlichen Nachmessung bzw. zur näheren Charakterisierung von Radioaktivitätsgipfeln zur Verfügung.

Die Zuordnung der Addukt-Peaks erfolgte nach BOOBIS et al. (1978), wobei die Lage des UV-Markers als innerer Standard zur Lagekorrektur diente. Zur Untermauerung der Zulässigkeit dieses Verfahrens wurde ein von PELKONEN et al. (1978) angegebener Versuch^{a)} in geringfügiger Modifikation wiederholt. Kalbsthymus-DNA wurde in einem NADPH-regenerierenden System zusammen mit ³H-Benzo(a)-pyren und mit Mikrosomen Methylcholanthren-vorbehandelter Ratten inkubiert, danach reisoliert und gereinigt. Das nach der oben beschriebenen Auftrennung der Benzpyren-Metabolit-Nukleosid-Addukte erhaltene Peak-Muster war mit dem von PELKONEN et al. (1978) angegebenen identisch.

a) dort mit Lachssperma-DNA und Mäuse-Mikrosomen

8. Reagenzien und Chemikalien

Die verwendeten Substanzen stammten, soweit sie nicht bereits angegeben wurden, von den nachstehenden Firmen.

Rinderserumalbumin trocken, reinst :	Behringwerke, Marburg
NADH, Dinatriumsalz, Grad I, 99 % ;	
NADPH, Tetranatriumsalz, Reinheits- grad II;	
Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz ;	
DNA, hochmolekular, aus Kalbsthymus;	
RNA aus Hefe ;	
DNase I aus Rinderpankreas, Rein- heitsgrad II (ca. 1000 Ein- heiten/ mg Lyophilisat nach Kunitz) ;	
RNase aus Rinderpankreas (ca. 40 Einheiten/mg Trockenpulver nach Kunitz) ;	
Proteinase K aus Tritirachium album (ca. 20 Einhei- ten/mg Lyophilisat) :	Boehringer, Mannheim
Venom Phosphodiesterase I von Crotalus adamanteus (ca. 30 Einheiten/mg Lyophilisat) :	Worthington, Biochemical Corp., Karlsruhe
Alkalische Phosphatase, Typ III, aus E. coli (ca. 30 Einhei- ten/mg Protein) ;	
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Typ VII, aus Hefe (ca. 300 Einheiten/mg Protein) ;	
4-(p-Nitrobenzyl)-pyridin ;	
Polyvinylsulfat (Kaliumsalz) :	Sigma, München

DNA aus Kalbsthymus, lyophilisiert;
Triisopropyl-naphthalinsulfonsäure,
Na-Salz, 2 x krist., rein;
p-Aminosalicylsäure, Na-Salz $\cdot 2 H_2O$
reinst: Serva, Heidelberg

3,3,3-Trichlorpropylenoxid ;
Benzo(a)pyren, 99 % ;
ß-Naphthoflavin ;
α-Naphthoflavin ;
Metyrapon : Aldrich Europe, Nettetal

3-Methylcholanthren : Eastman Kodak Co.,
Rochester, N.Y., USA

Äthylglykol = Äthoxyäthanol purum ;
m-Kresol purum : Roth, Karlsruhe

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen
und waren von analytischem Reinheitsgrad.

9. Auswertung der Ergebnisse und statistische Verfahren

Jeder Perfusions- oder Inkubationsversuch lieferte für die jeweils gewünschten Meßgrößen auch bei Doppel- und Mehrfachbestimmungen nur je einen (gemittelten) Wert. Der Betrag der Hintergrundbindung (vgl. 5.2.) wurde, sofern überhaupt feststellbar, nicht abgezogen.

Von den einzelnen Gruppen wurden der Mittelwert (arithmetisches Mittel $\bar{x}$), die Standardabweichung (s) und die Standardabweichung des Mittelwerts ($s_{\bar{x}}$) errechnet. Die Mittelwerts-Unterschiede wurden nach Vergleich der Varianzen (F-Test) mit dem Student-t-Test für zwei unverbundene Stichproben bei zweiseitiger Fragestellung verglichen. Die bei der Versuchsplanung zugrundegelegte Irrtumswahrscheinlichkeit betrug in allen Fällen $\alpha < 0,05$.

IV. Ergebnisse

Experiment A: Rattenleberperfusionen (Induktoren und Inhibitoren)

In dieser Versuchsgruppe wurde 60 Minuten lang mit $\sim 100 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren (zugegeben in 0,6 ml Äthanol) perfundiert. Die eingesetzte Radioaktivität betrug im allgemeinen 40-200 μCi ; nur bei anschließender Auftrennung von Metabolit-Nukleosidaddukten wurden 8,3 mCi verwendet.

Modifikation der Mikrosomenfraktion durch Monooxygenase-Induktoren

Der Effekt der Vorbehandlung mit den Monooxygenase-Induktoren Phenobarbital (PB) und β -Naphthoflavon (BNF) auf Hämoprotein-gehalte und weitere Parameter der Mikrosomenfraktion perfundierter Rattenlebern ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Werte von öl- bzw. kochsalzbehandelten Tieren weisen keine auffälligen Unterschiede auf und sind daher in einer gemeinsamen Kontrollgruppe zusammengefaßt.

Tabelle 1. Charakterisierung der Mikrosomenfraktion von perfundierten Rattenlebern

Vorbe- hand- lung	Cytochrom P-450 (nmol/mg Protein)	λ_{max} des CO-Spektrums (nm)	Cytochrom b_5 (nmol/mg Protein)	Radioaktivität (DPM $\times 10^{-3}$ /mg Protein)
Kontrolle	$0,96 \pm 0,04$ (6)	$449,8 \pm 0,3$ (6)	$0,71 \pm 0,06$ (3)	69 ± 14 (4)
PB	$1,43 \pm 0,07$ (10)*	$450,0 \pm 0,0$ (8)	$0,77 \pm 0,05$ (8)	24 ± 13 (4)*
BNF	$1,29 \pm 0,07$ (13)*	$448,3 \pm 0,2$ (13)*	$0,66 \pm 0,05$ (5)	14 ± 2 (5)*

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n); * $\alpha < 0,05$ (verglichen mit Kontrolle)

Wie zu fordern ist, steigt der Cytochrom P-450-Gehalt nach Gabe der Induktoren an. Dies geht bei BNF einher mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des reduzierten Cytochrom P-450-CO-

Komplexes zu kürzerer Wellenlänge hin (auf fast 448 nm). Der Cytochrom b_5 -Gehalt ist erwartungsgemäß statistisch nicht auffällig verändert. Radioaktivitätsmessungen in der Mikrosomenfraktion ergeben nach Induktion eine deutlich niedrigere Impulsrate als bei Kontrollen.

Modifikation der irreversiblen Bindung durch Monooxygenase-Induktoren

Tabelle 2 zeigt das Ausmaß der irreversiblen Bindung von Benzpyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle der Leber nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Ratten. Die Bindung an DNA nimmt nach Vorbehandlung mit dem Cytochrom P-450-Induktor Phenobarbital ebenso wie nach Vorbehandlung mit β -Naphthoflavon als einem Induktor von Cytochrom P-448 deutlich zu. Für die Bildung von reaktiven Benzpyren-Metaboliten sind offenbar Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen verantwortlich. Die Induktionsfaktoren sind 2 nach PB- und 5 nach GNF-Vorbehandlung.

Tabelle 2. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle perfundierter Rattenlebern

Vorbehandlung	DNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	RNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	Protein (pmol BP-Äquivalente/mg)
NaCl	$7,8 \pm 1,5$ (11)	$39,3 \pm 7,2$ (11)	$37,1 \pm 4,4$ (11)
PB	$18,4 \pm 2,7$ (12)*	$35,1 \pm 4,6$ (12)	$42,8 \pm 6,4$ (12)
Öl	$3,9 \pm 0,3$ (6)	$31,4 \pm 5,3$ (7)	$26,1 \pm 3,7$ (7)
GNF	$21,8 \pm 3,8$ (11)*	$328,7 \pm 57,6$ (11)*	$55,5 \pm 3,5$ (11)*

Die Benzo(a)pyren-Konzentration betrug 100 μ M.

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n); * $\alpha < 0,05$ (verglichen mit Kontrolle)

Der Effekt der Monooxygenase-Induktion auf die irreversible Bindung von Benzpyren-Äquivalenten an RNA und Protein unterscheidet sich von den Effekten auf die DNA-Bindung. Nur GNF, nicht aber PB vermag die Bindungsrate an diese Makromolekülfractionen zu

steigern. In der RNA-Fraktion ist bei einigen Präparationen ein Proteinanteil in Höhe der RNA-Menge enthalten, der auf funktionell mit der RNA verbundenes Protein zurückgeführt wird. Dieses Protein scheint, wie auch aus der Aufklärung der nukleosidaddukte hervorgeht, für das Ausmaß der Bindungszunahme keine wesentliche Bedeutung zu haben. Die irreversible Bindung an die RNA-Fraktion steigt nach GNF-Vorbehandlung um das 10fache an. Der Induktionsfaktor bei phenolextrahierbarem Protein beträgt demgegenüber lediglich 2.

Modifikation der irreversiblen Bindung durch Monooxygenase-Inhibitoren

Aus Abbildung 2 geht hervor, daß die Bildung von DNA-Addukten sowohl nach GNF-, als auch nach PB-Vorbehandlung beim Zusatz von Monooxygenasehemmstoffen zum Perfusionsmedium vermindert ist.

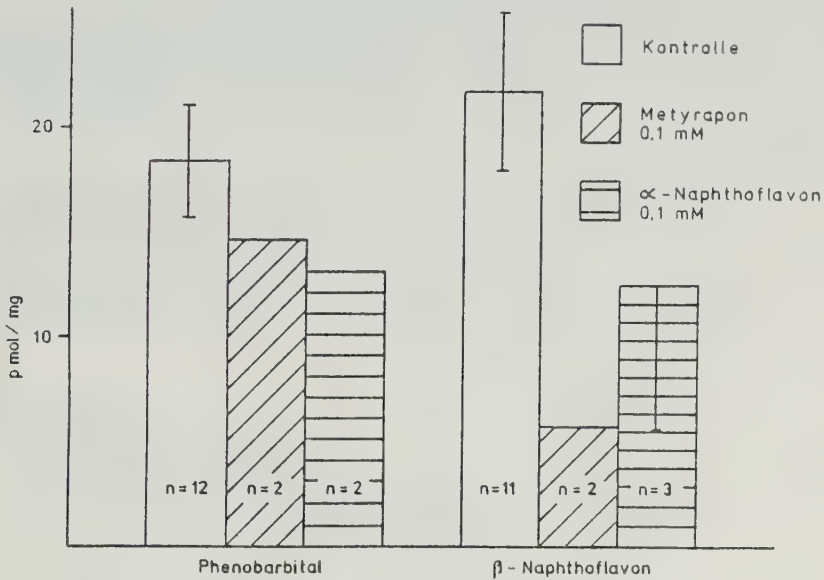


Abbildung 2. Inhibition der irreversiblen DNA-Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten in perfundierten Rattenlebern durch Monooxygenase-Hemmstoffe

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ bzw. die arithmetischen Mittelwerte von zwei Versuchen

Bei einem Teil der ohne Inhibitoren perfundierten Rattenlebern wurden ersatzweise entsprechende Lösungsmittelvolumina zugesetzt. Die Werte dieser Lebern sind von den Werten der ohne jeglichen Zusatz perfundierten Lebern nicht auffällig abweichend und daher, wie auch bei Tabelle 2 und Tabelle 3, zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefaßt.

α -Naphthoflavin, das als spezifischer Inhibitor von Cytochrom P-448-abhängiger Monooxygenase-Aktivität gilt (WIEBEL et al., 1971), setzt die Bindung an DNA um ungefähr 40 % in BNF-vorbehandelten Lebern herab, aber auch um ca. 30 % bei PB-stimulierten Lebern. Metyrapon, von dem angenommen wird, daß es vorzugsweise den nichtinduzierten und PB-induzierten mikrosomalen Stoffwechsel hemmt (GOUJON et al., 1972), scheint ebenfalls nach beiden Vorbehandlungsarten zu einer Abnahme der Bindungsrate zu führen.

Irreversible Bindung bei Anwesenheit eines Epoxidhydratase-Inhibitors

Tabelle 3 zeigt die Bindungswerte von Benzpyren nach Zugabe des Epoxidhydratasehemmstoffs 3,3,3-Trichlorpropylenoxid (TCPO) zum Perfusionsmedium. In der verhältnismäßig hohen Konzentration von 0,5 mM führt TCPO zu keiner auffälligen Änderung der Bindungsrate.

Tabelle 3. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle perfundierter Rattenlebern in Anwesenheit von 3,3,3-Trichlorpropylenoxid als Epoxidhydratasehemmstoff

	DNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	RNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	Protein (pmol BP-Äquivalente/mg)
PB	18,4 $\pm$ 2,7 (12)	35,1 $\pm$ 4,6 (12)	42,8 $\pm$ 6,4 (12)
PB + TCPO	13,0 $\pm$ 3,1 (10)	41,0 $\pm$ 5,7 (10)	49,1 $\pm$ 3,9 (10)
BNF	21,8 $\pm$ 3,8 (11)	328,7 $\pm$ 57,6 (11)	55,5 $\pm$ 3,5 (11)
BNF + TCPO	22,8 $\pm$ 4,5 (6)	175,6 $\pm$ 28,4 (6)	49,4 $\pm$ 6,8 (6)

Die TCPO-Konzentration betrug 0,5 mM.

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n).

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten

Eine annähernde Identifikation der gebundenen Benzpyren-Metaboliten erfolgt durch das Aufstellen von Elutionsprofilen hydrolysierter Nukleinsäuren nach säulenchromatographischer Auftrennung, wie sie in Abbildungen 3 und 4 wiedergegeben sind.

Die nach Enzyminduktion in Lebermikrosomen von Nagern gebildeten Benzpyrenmetabolit-Desoxyribonukleosidkomplexe ergeben nach Sephadex LH-20-Chromatographie mindestens 9 Peaks, die nach BOOBIS et al. (1978) und PELKONEN et al. (1978) mit A bis I bezeichnet werden und nach abnehmender Polarität geordnet sind. Die Zuordnung der Peaks geschieht durch die Verwendung der betreffenden Benzpyren-Metaboliten, soweit sie synthetisiert vorliegen (PELKONEN et al., 1978; BOOBIS et al., 1978; vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4. Identifikation von DNA-gebundenen Benzo(a)pyren-Metaboliten, die in vitro durch Lebermikrosomen gebildet werden

Peak	Fraktionsnummer, bei der Peaks erscheinen	Vorläufer	Ultimate aktive Form des Benzo(a)pyren-Metaboliten, der hauptsächlich zum Peak beiträgt
A	62	Dihydrodiol(e)	Unbekannte(s) Dihydrodioloxid(e)
B	71	Chinon(e)	Chinonoxid(e) (oder daraus entstehende freie Radikale)
C	86	Dihydrodiol(e)	Unbekannte(s) Dihydrodioloxid(e)
D	98	Chinon(e)	Chinonoxid(e) (oder daraus entstehende freie Radikale)
E	105	7,8-Dihydrodiol	7,8-Diol-9,10-epoxide (cis und trans)
F	122	Chinon(e)	Chinonoxid(e) (oder daraus entstehende freie Radikale)
F'	115	Benzo(a)pyren	7,8-Oxid
G	134	Benzo(a)pyren	4,5-Oxid
H	155	Phenol(e)	Unbekannte(s) Phenoloxid(e)
I	171	Chinon(e)	Chinonoxid(e) (oder daraus entstehende freie Radikale)

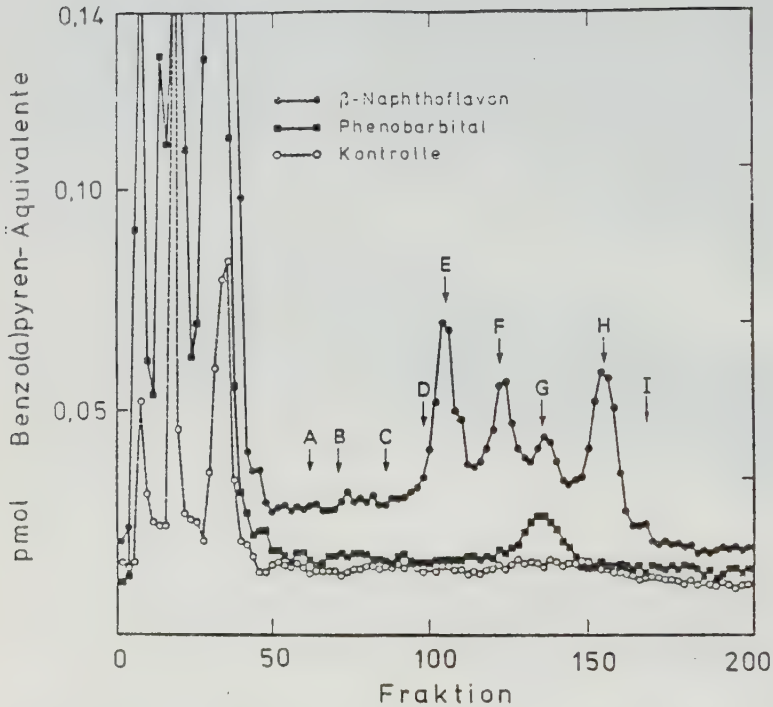


Abbildung 3. Elutionsprofile von hydrolysiertter DNA aus induzierten Rattenlebern nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 60 Minuten lang mit $\sim 100 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

Abbildung 3 zeigt die Elutionsprofile der Desoxyribonukleoside von einzelnen perfundierten Rattenlebern. Bei der mit Öl vorbehandelten Leber ist kein spezifischer Peak nachweisbar, der einem bekannten Addukt zugeordnet werden könnte. Ein hoher Anteil von unidentifiziertem polaren Material wird bei allen Versuchen mit den ersten 50 Fraktionen eluiert. Bei Phenobarbital-Vorbehandlung ist nur ein Peak (G), der dem 4,5-Komplex zugeordnet wird, nachweisbar. Nach BNF-Vorbehandlung sind noch mindestens

3 weitere Peaks (E, F, ¹⁴H) vorhanden, von denen der Peak E am ausgeprägtesten ist, der die Addukte der 7,8-Diol-9,10-epoxide repräsentiert. Die Peaks F und H bestehen ebenfalls zur Hauptsache aus Addukten mit sekundären Benzo(a)pyrenmetaboliten.

In Abbildung 4 sind die in der Rattenleber gebildeten Ribonukleosidaddukte mit Benzpyrenmetaboliten zu sehen. In der Kontrolleleber sind, wenn auch nur schwach ausgebildet, die Peaks E, G und H nachweisbar, während bei der mit Phenobarbital vorbehandelten Le-

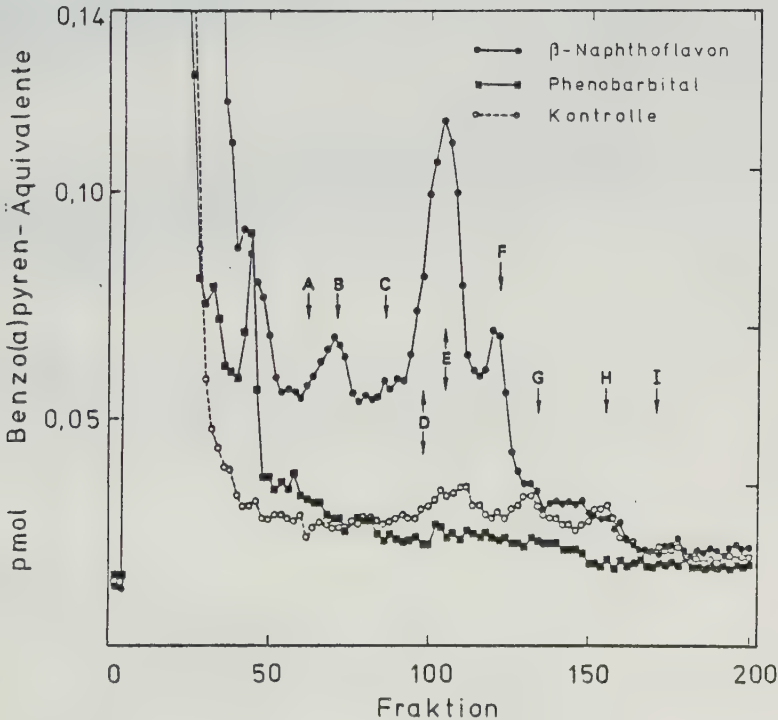


Abbildung 4. Elutionsprofile von hydrolysierteter RNA aus induzierten Rattenlebern nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 60 Minuten lang mit $\sim 100 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

ber keine Radioaktivitätsgipfel im Elutionsprofil erkennbar sind. Bei GNF-Vorbehandlung, die zu einer auffälligen Steigerung der Bindung an die RNA-Fraktion führt, werden auch hohe Addukt-Peaks gefunden. Der Hauptpeak (E) besteht wieder aus den Addukten der 7,8-Diol-9,10-epoxide. Daneben sind die Peaks B und F vorhanden, die beide zu Nukleosidaddukten mit sekundären Chinonmetaboliten des Benzopyrens in Beziehung gesetzt werden. Die Peaks G und H, die das 4,5-Oxid-Addukt und Phenoloxidkomplex(e) darstellen, sind hier im Gegensatz zur DNA nicht nachzuweisen.

Modifikation der biliären Exkretion von Benzo(a)pyren durch Monooxygenase-Induktoren

Die Menge der pro g Leber durch die Galle ausgeschiedenen Radioaktivität ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

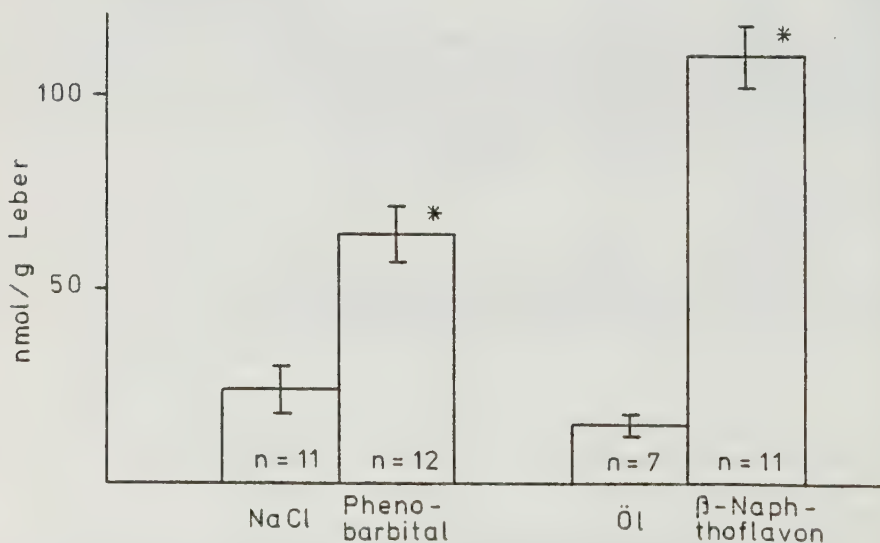


Abbildung 5. Exkretion von Benzo(a)pyren-Äquivalenten in die Galle von perfundierten Rattenlebern

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; * $\alpha < 0,05$

Bei Kontrollebern befinden sich nach einstündiger Perfusion ca. 6 % der eingesetzten Radioaktivität im Gallensekret. Bei Lebern, deren Monooxygenaseaktivität induziert ist, findet man eine deutlich gesteigerte Ausscheidungsrate, die ca. 23 % des eingesetzten Benzo(a)pyrens nach PB-Vorbehandlung und ca. 39 % nach Vorbehandlung mit GNF erreicht.

Die durchschnittlichen Leberfeuchtgewichte sind 10,5 g (NaCl), 12,9 g (PB), 10,9 g (Öl) und 12,0 g (GNF).

Die durchschnittlichen Gallensekret-Volumina betragen 0,36 ml (NaCl), 0,42 ml (PB), 0,38 ml (Öl) und 0,39 ml (GNF).

Experiment 8: Rattenleberperfusionen (Zeitverläufe)

In dieser Versuchsgruppe fanden nur Ratten Verwendung, die mit β -Naphthoflavin vorbehandelt waren. Die Lebern wurden unterschiedlich lange (0-120 Minuten) mit ^3H -Benzo(a)pyren, das in 0,3 ml Äthanol in einer effektiven Anfangskonzentration von $\sim 0,7 \mu\text{M}$ im Perfusat zugegeben wurde, perfundiert. Diese im Vergleich zur vorangegangenen Versuchsserie (Experiment A) 100fach niedrigere Benzpyren-Konzentration wurde im Hinblick auf die geringen Benzpyren-Mengen gewählt, denen die menschliche Bevölkerung ausgesetzt ist. Die effektiv eingesetzte Radioaktivität betrug $\sim 1,1 \text{ mCi}$.

Zeitverlauf der Benzo(a)pyren-Konzentrationen in Perfusat, Gewebe und Galle

Die Disposition (Verteilung und Elimination) der eingesetzten Benzpyren-Äquivalente ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Die Summe der nach 5-, 10-, 15-, 20-, 40-, 60- und 120-minütiger Perfusion jeweils im Restperfusat, Lebergewebe und Gallensekret aufgefundenen Äquivalente ist in der punktierten Zone als Wiederfund (ca. 78 %) aufgetragen.

Bei der Abnahme der Konzentration im Perfusat ist ein biphasischer Verlauf festzustellen, wobei der initiale steile Abfall ca. 20 Minuten anhält. Im Lebergewebe ist nach 15-minütiger Perfusion ein Maximum an Äquivalenten zu finden; anschließend nimmt die Konzentration durch Eliminationsvorgänge langsam wieder ab. Die biliäre Ausscheidung ist in Abbildung 6 kumulativ aufgetragen. Aus Abbildung 7 ergibt sich eine maximale Sekretionsgeschwindigkeit der Galle nach ca. 20 Perfusionsminuten.

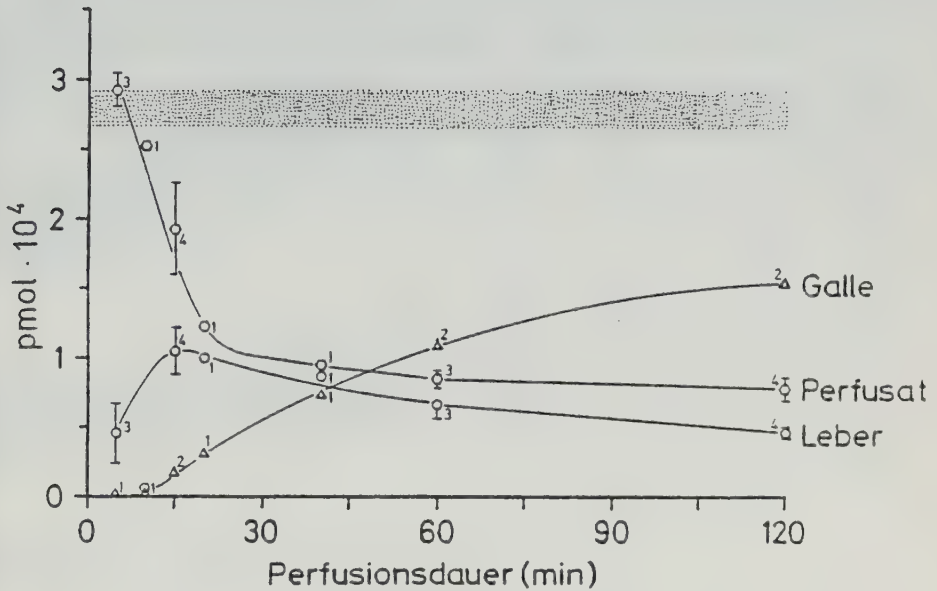


Abbildung 6. Konzentrations-Zeitkurven von Benzo(a)pyren-Äquivalenten bei Rattenleberperfusionen

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ und n. Die punktierte Zone stellt den Streubereich ($2s_{\bar{x}}$) der zu den einzelnen Zeitpunkten im Perfusat, in der Leber und in der bis dahin ausgeschiedenen Galle vorliegenden Benzo(a)pyren-Äquivalente dar.

a = 0-10 min
b = 10-20 min
c = 20-30 min
d = 30-40 min
e = 40-50 min
f = 50-60 min
g = $\frac{60-120 \text{ min}}{6}$

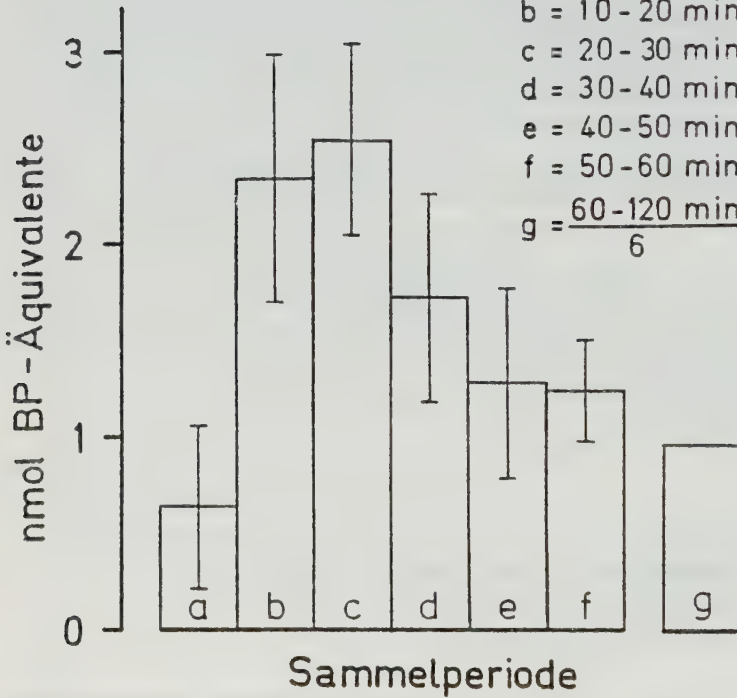


Abbildung 7. Zeitverlauf der biliären Exkretion von Benzo(a)pyren

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_x$ (n=3) der innerhalb der Sammelperioden a bis f ausgeschiedenen Benzo(a)pyren-Äquivalente. Die Säule g stellt den Mittelwert von 2 Versuchen dar.

Zeitverlauf der irreversiblen Bindung

Zur Klärung der Frage, ob die Abnahme der Benzpyren-Konzentration im Lebergewebe bei einer Perfusionsdauer von mehr als 15 Minuten nur die Ausschleusung von nicht an Makromoleküle gebundenen Metaboliten widerspiegelt oder ob auch die irreversibel gebundene Aktivität bereits innerhalb der ersten 2 Stunden eine Abnahme erkennen läßt, tragen die Abbildungen 8a - 8c bei.

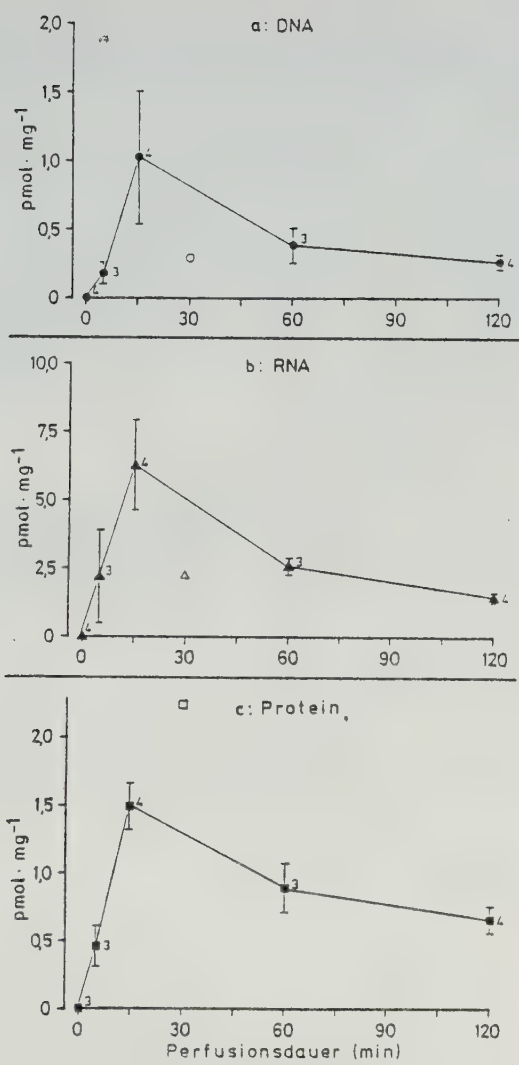


Abbildung 8. Zeitverlauf der irreversiblen Bindung von Benzo(a)-pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle perfundierter Rattenlebern

Angegeben sind $\bar{x} \pm s$ und n. In einem Einzelversuch (offene Symbole) wurde nach 15-minütiger Perfusion noch einmal ~ 35 nmol ³H-Benzo(a)pyren zum Perfusionsmedium zugesetzt und weitere 15 Minuten perfundiert.

Es ist zu sehen, daß auch die irreversible Bindung an die Makromoleküle nach 15 Minuten maximal ist und während der folgenden 105 Minuten wieder zurückgeht. Die Annahme, daß es sich dabei nicht um Phänomene unspezifischer Bindung und Verteilung handelt, wird außer durch die Analyse des Nukleosidaddukt-Musters (Abbildungen 9 und 10) noch durch einen Versuch erhärtet, bei dem nach 15-minütiger Leberperfusion ein zweites Mal ^3H -Benzo(a)pyren in gleicher Menge und gleicher radioaktiver Markierung wie zu Anfang zugesetzt wurde. Die nach einer Gesamtperfusionsdauer von 30 Minuten erhaltenen Bindungswerte sind in den Abbildungen 8a - 8c durch offene Symbole gekennzeichnet. Nur bei der Proteinfraktion steigt die Bindung der Benzpyrenreste an, während bei den Nukleinsäurefraktionen trotz erhöhter Benzpyrenkonzentration im Perfusat wiederum ein Rückgang der Bindung zu beobachten ist.

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten

Abbildung 9 zeigt die Elutionsprofile der Desoxyribonukleoside von je 2 - 3 Rattenlebern nach 5-, 15-, 60- und 120-minütiger Perfusion. Die Lage der Addukt-Peaks ist hier infolge atypischer Trennsäuleneigenschaften (vermutlich wegen teilweise verstopfter unterer Abschlußplatte) im Vergleich zu den von BOOBIS et al. (1978) angegebenen Fraktionsnummern um einige Fraktionen verschoben. In einem nicht gezeigten Wiederholungsversuch wurden daher nochmals Nukleosidaddukte von Rattenlebern, die 15 bzw. 60 Minuten perfundiert waren, mit einer neu gepackten Säule getrennt. Dabei erschienen die Addukt-Peaks wieder in den üblichen Fraktionen der eluierten Säule.

Die sich als Fläche unter den Peaks ergebende Addukt-Gesamtkonzentration ist erwartungsgemäß nach 15 Minuten maximal; nach 60 Minuten werden bereits weniger Addukte aufgefunden. Hervorzuheben ist die längere Persistenz des Peak E, der die Addukte der als besonders kanzerogen angesehenen cis- und trans-7,8-Diol-9,10-epoxide repräsentiert, im Vergleich zu Peak H, der wohl zur Haupt-

sache aus den Addukten besteht, die aus dem weiteren Metabolismus des 9-Hydroxybenzo(a)pyrens hervorgehen (PELKONEN et al., 1978).

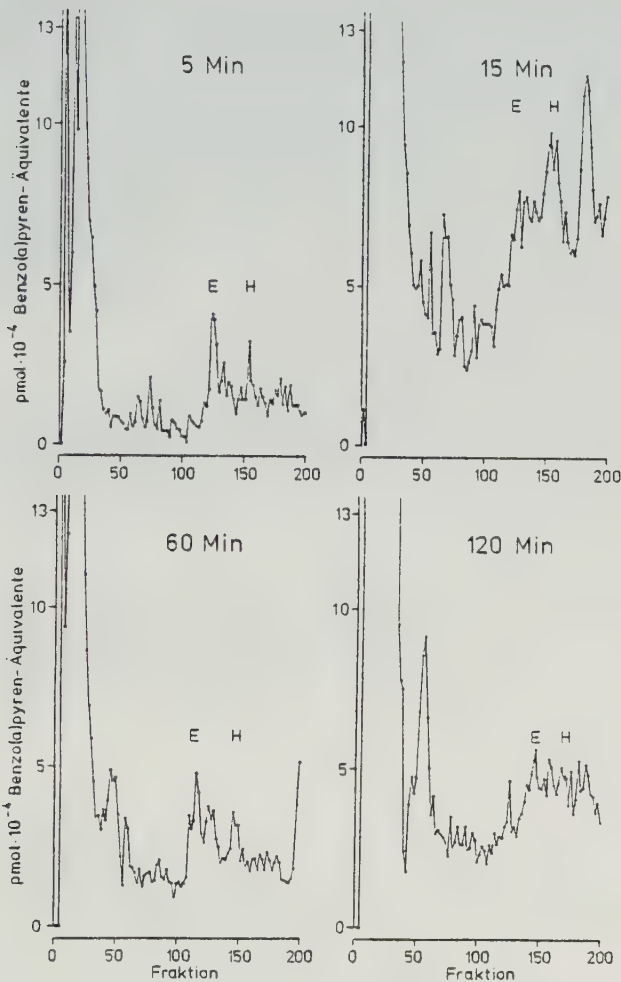


Abbildung 9. Elutionsprofile von hydrolysierten DNA aus BNF-induzierten Rattenlebern nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 5-120 Minuten lang mit $\sim 0,7 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

In Abbildung 10, in der die Elutionsprofile der nach unterschiedlicher Perfusionsdauer gebildeten Ribonukleosidaddukte zu sehen sind, ist die Lage der Addukt-Peaks ebenfalls gegenüber den Sollwerten verschoben. Auch hier bestätigte der oben angegebene Wiederholungsversuch mit der neugepackten Säule die Richtigkeit der Addukt-Zuordnung.

Die Addukt-Gesamtmenge ist nach 15 Minuten wieder am größten. Nachweisbar sind außer den Diolepoxid-Addukten (Peak E) Addukte mit sekundären Chinonmetaboliten (Peak F), wobei die Diolepoxid-Komplexe - wie bei der DNA-Fraktion - länger persistieren. Ob daneben Peak B existiert, der bei der Leberperfusion eines BNF-vorbehandelten Tiers mit $100 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren gefunden wurde (Abbildung 4), ist nicht sicher festzustellen.

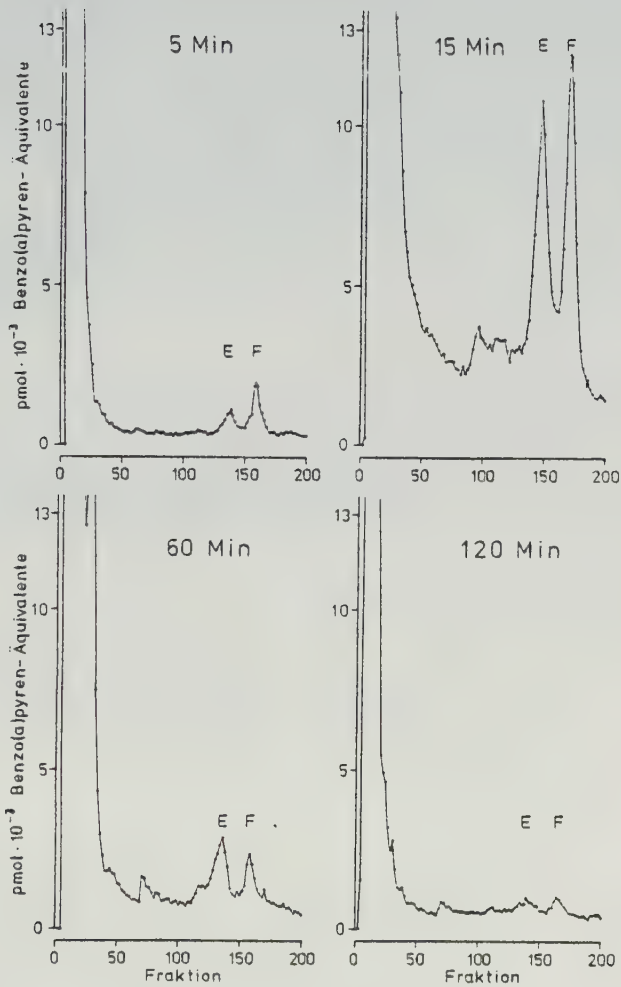


Abbildung 10. Elutionsprofile von hydrolysiert RNA aus BNF-induzierten Rattenlebern nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 5-120 Minuten lang mit $\sim 0,7 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

Experiment C: Rattenlungenperfusionen (Induktoren)

In dieser Versuchsgruppe wurde 60 Minuten lang mit $\sim 1 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren (zugegeben in 0,3 ml Äthanol) perfundiert. Die eingesetzte Radioaktivität betrug $\sim 0,5 \text{ mCi}$ bei Versuchen zur Ermittlung der Gesamtbindung. Zur Adduktanalyse wurden bei 8 Lungen von Ratten, die mit β -Naphthoflavon vorbehandelt waren, je $\sim 1,5 \text{ mCi}$ verwendet.

Modifikation der irreversiblen Bindung durch Monooxygenase-Induktoren

Tabelle 5 zeigt das Ausmaß der irreversiblen Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle der Lunge nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Ratten. Die RNA-Fraktion enthält, wie auch bei Experiment A, einen Proteinanteil, der aber hier nur maximal 20 % der RNA-Menge erreicht.

Tabelle 5. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle perfundierter Rattenlungen

Vorbehand- lung	n	DNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	RNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	Protein (pmol BP-Äquivalente/mg)
NaCl	5	$0,04 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,21$
PB	5	$0,06 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,10$	$1,25 \pm 0,33$
Öl	4	$0,02 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,17$
BNF	5	$0,45 \pm 0,12 *$	$2,46 \pm 0,59 *$	$7,61 \pm 1,88 *$

Die Benzo(a)pyren-Konzentration betrug $1 \mu\text{M}$.

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n); * $\alpha < 0,05$ (verglichen mit Kontrolle)

Während bei Lungen von Kontrolltieren die Bindung an Nukleinsäuren und Protein nur schwach ausgeprägt ist, nimmt sie nach Vorbehandlung der Ratten mit dem Cytochrom P-448-Induktor GNF

um den Faktor 15-23 zu. Nach Gabe von PB als einem Induktor von Cytochrom P-450 wird nur ein geringfügiger Bindungsanstieg, der statistisch nicht auffällig ist, beobachtet. Dieser Befund unterscheidet sich von den Ergebnissen, die bei Rattenleberperfusionen mit 100 μ M Benzpyren erhalten werden (Experiment A): die DNA-Bindung nimmt dort nach PB-Induktion signifikant zu.

Die durchschnittlichen Lungenfeuchtgewichte betragen am Ende der Perfusion 1,7 g (NaCl), 1,4 g (PB), 1,9 g (Öl) und 1,5 g (BNF).

Aufklärung des Nukleosiddaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten

Abbildung 11 zeigt das Adduktmuster der Desoxyribonukleoside von 8 perfundierten Lungen BNF-vorbehandelter Ratten.

Im Elutionsprofil fallen neben den zwei größeren Peaks E und H (Diolepoxid- und Phenoloxidkomplexe) zwei kleinere Peaks (F und I) auf, die zur Hauptsache Addukte mit Sekundärmetaboliten von Benzpyren-Chinonen darstellen. Ein sehr großer Peak, dessen chemische Natur noch unbekannt ist, erscheint ungefähr ab Fraktion 200. Dieser unidentifizierte Peak ist auch in Abbildung 9 (15 und 60 Min) sichtbar.

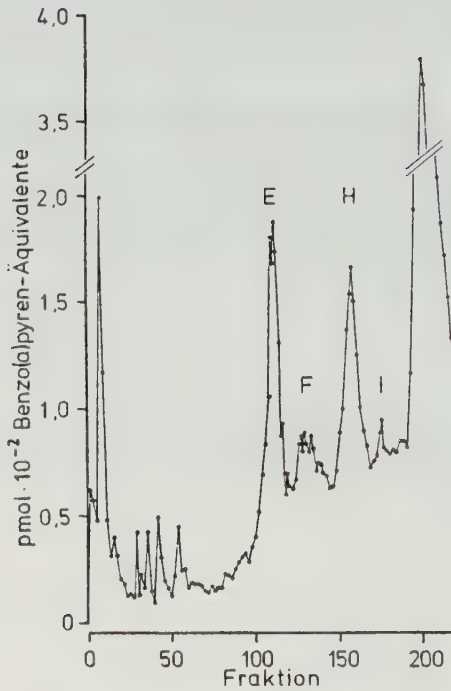


Abbildung 11. Elutionsprofil von hydrolysiertter DNA aus 8 BNF-induzierten Rattenlungen nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 60 Minuten lang mit $\sim 1,5 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

Experiment D: Kombiniertes Perfusionssystem

Rattenleber-Rattenlunge

Ergebnisse von Versuchen, die erhellen sollten, ob in der Leber gebildete Benzo(a)pyren-Metaboliten in der Lage sind, in reaktivem Zustand in andere Organe zu gelangen und dort an zelluläre Makromoleküle gebunden zu werden, sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Dazu wurde der isoliert perfundierten Lunge einer BNF- oder unvorbehandelten Ratte die Leber eines anderen, unterschiedlich vorbehandelten Tiers vorgeschaltet. Die Perfusion geschah jeweils mit $\sim 1 \mu\text{M}$ (in einem Einzelversuch mit $\sim 10 \mu\text{M}$) ^3H -Benzo(a)pyren ($\sim 1,5 \text{ mCi}$) im Perfusat und dauerte 30 Minuten.

Es fällt zunächst auf, daß die irreversible Bindung an die Makromoleküle von Lungen unvorbehandelter Ratten gering und vom Induktionszustand der Leber unabhängig ist (Versuche 1 und 2). Die Bindungsrate an Lungenprotein ist noch geringer als bei allein perfundierten Öl-vorbehandelten Lungen (Versuch 7). Daß die Bindungswerte der BNF-induzierten Lebern (Versuch 2) höher liegen als bei allein perfundierten Organen (Versuch 6), ist mit der kürzeren, näher beim Bindungsmaximum liegenden Perfusionszeit zu erklären (vgl. Experiment B).

Zur Ergänzung und Interpretation der Ergebnisse in den standardisierten Versuchen wurden Einzelversuche unter variierten Bedingungen durchgeführt. Bei Lungen von BNF-vorbehandelten Tieren (Versuche 3 und 4) weisen die Makromoleküle gegenüber denen nicht-induzierter Lungen (Versuche 1 und 2) eine deutlich erhöhte Bindung auf, wobei die Induktion der Leber mit BNF eher zu einer Abnahme der Bindung an Lungen-Makromoleküle zu führen scheint. Für eine solche "Entgiftungsleistung" der vorgeschalteten induzierten Leber spricht auch, daß trotz kürzerer, näher beim Bindungsmaximum liegender Perfusionszeit die Bindungswerte der Lungen-Makromoleküle (Versuche 3 und 4) niedriger sind als die von allein perfundierten Organen (Versuch 8). Auch steigt bei 10fach höherer Benzo(a)pyrenkonzentration im Perfusionsmedium (Versuch 5) im Ver-

Tabelle 6. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle kombiniert perfundierter Rattenlebern und -lungen

Ver- such	bp-Konzen- tration im Perfusat	Perfusi- onsdauer (min)	Vorbehandlung		Leber		Lunge			
			Leber	Lunge	irreversible Bindung DNA	BP-Äquivalente/mg Protein	irreversible Bindung DNA	BP-Äquivalente/mg Protein		
1	1 μ M	30	Öl	-	0,29 $\pm$ 0,08 (4)	2,04 $\pm$ 0,59 (4)	0,43 $\pm$ 0,08 (4)	0,02 $\pm$ 0,00 (4)	0,10 $\pm$ 0,06 (4)	0,17 $\pm$ 0,07 (4)
2	1 μ M	30	BNF	-	0,61 $\pm$ 0,11 (4)	4,80 $\pm$ 0,61 (4)	0,93 $\pm$ 0,13 (4)	0,02 $\pm$ 0,00 (4)	0,10 $\pm$ 0,07 (4)	0,16 $\pm$ 0,03 (3)
3	1 μ M	30	BNF	BNF	0,38 (1)	3,52 (1)	1,38 (1)	0,10 (1)	0,30 (1)	1,42 (1)
4	1 μ M	30	-	BNF	0,25 (1)	1,95 (1)	0,74 (1)	0,19 (1)	0,52 (1)	2,05 (1)
5	10 μ M	30	BNF	-	3,05 (1)	31,20 (1)	7,59 (1)	0,06 (1)	0,17 (1)	1,34 (1)
6	1 μ M	60	Leber:	BNF	0,39 $\pm$ 0,23 (3)	2,64 $\pm$ 0,49 (3)	0,89 $\pm$ 0,31 (3)	0,02 $\pm$ 0,01 (4)	0,12 $\pm$ 0,03 (4)	0,50 $\pm$ 0,17 (4)
7	1 μ M	60	Lunge:	Öl				0,45 $\pm$ 0,12 (5)	2,46 $\pm$ 0,59 (5)	7,61 $\pm$ 1,18 (5)
8	1 μ M	60	Lunge:	BNF						

Angaben sind $\bar{x} \pm s_x$ (n); zum Vergleich sind im unteren Teil der Tabelle die Bindungswerte für allein perfundierte Organe angegeben (Versuche 6 - 8; vgl. Tab. 5 und Abb. 8c).

gleich zur niedrigeren Konzentration (Versuch 2) die Bindung an Nukleinsäuren der Lunge weniger stark an (Faktor 3 bei DNA und Faktor 1,7 bei RNA) als bei den Nukleinsäuren der Leber (Faktoren 5 bzw. 6,5). Nur bei den Proteinfractionen sind die Bindungszunahme-Faktoren (8,4 und 8,2) vergleichbar.

Experiment E: Mäuseleberperfusionen

Konzentrationsabhängigkeit der irreversiblen Bindung

Ergebnisse von einigen Mäuseleberperfusionen, die über die Abhängigkeit der Bindungsrate von der im Perfusionsmedium vorhandenen Benzo(a)pyren-Konzentration Aufschluß geben sollen, sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Bei diesen Versuchen wurde 30 Minuten mit 2,5-100 μM ^3H -Benzo(a)pyren (jeweils 5 mCi) perfundiert. Da die Radioaktivitätsmenge von 5 mCi an der Nachweisgrenze der chromatographischen Adduktaufklärung lag und die spezifische Aktivität des Tracers nur 40 Ci/mmol betrug, konnte keine niedrigere Konzentration als 2,5 μM Benzo(a)pyren (50 ml Perfusat) verwendet werden.

Tabelle 7. Konzentrationsabhängigkeit der irreversiblen Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle perfundierter Lebern von MC-vorbehandelten Mäusen des Stammes C57BL/6N

BP-Konzentration im Perfusat	DNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	RNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	Protein (pmol BP-Äquivalente/mg)
2,5 μM	0,93 $\pm$ 0,24 (4)	4,35 $\pm$ 1,30 (4)	3,38 $\pm$ 0,39 (4)
10 μM	1,22 (2)	14,16 (1)	11,90 (2)
100 μM	12,85 (1)	99,97 (1)	79,54 (1)

Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ (n).

Es ist zu sehen, daß eine Konzentrationsabhängigkeit der Bindung besteht, wobei die RNA- und Protein-Fractionen gleiche Zunahmeraten besitzen. Bei Erhöhung der Benzo(a)pyrenkonzentration von 2,5 μM auf 10 μM nimmt dort die Bindung um den Faktor 3 bzw. 3,5 zu; wennman die Konzentrationen 2,5 μM und 100 μM vergleicht, ergeben sich die Faktoren 23 und 24. Demgegenüber ist der Bindungsanstieg bei der DNA-Fraktion mit dem Faktor 1,3 beim Vergleich von 2,5 μM und 10 μM und dem Faktor 14 beim Vergleich von 2,5 μM und 100 μM um ungefähr die Hälfte geringer.

Modifikation der irreversiblen Bindung bei genetisch "responsiven" und "nicht-responsiven" Mäusestämmen

Um die Bedeutung der genetisch fixierten Induzierbarkeit der Benzpyren-Hydroxylase durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe für die Höhe der irreversiblen Bindung abschätzen zu können, wurden in orientierenden Einzelversuchen Mäuse des hinsichtlich der Cytochrom P-448-Induktion genetisch "responsiven" Stammes C57BL/6N (B6) und Mäuse des genetisch "nicht-responsiven" Stammes DBA/2N (D2) verwendet. Die Lebern der mit Methylcholanthren (MC), Pheno-barbital oder Öl vorbehandelten Tiere wurden 30 Minuten lang mit $2,5 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren (jeweils 5 mCi) perfundiert. Die Bindungswerte der zellulären Makromoleküle sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle einzelner perfundierter Lebern vorbehandelter Mäuse verschiedener Stämme

Stamm	Vorbe- hand- lung	DNA	RNA	Protein
		(pmol BP-Äquivalente/mg)	(pmol BP-Äquivalente/mg)	(pmol BP-Äquivalente/mg)
B 6	MC	$0,93 \pm 0,24^S$	$4,35 \pm 1,30^S$	$3,38 \pm 0,39^S$
D 2	MC	0,23	1,03	2,87
B 6	PB	0,16	0,48	2,24
D 2	PB	0,11	0,42	1,46
B 6	Öl	0,04	0,32	1,17

Die Benzo(a)pyren-Konzentration betrug $2,5 \mu\text{M}$.

$^S \bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ von 4 Versuchen (vgl. Tab. 7)

Soweit sich aus den Ergebnissen der wenigen Versuche Schlüsse ziehen lassen, bestätigen sie die Erwartung, daß bei MC-vorbehandelten Tieren die Makromoleküle "responsiver" B6-Mäuse eine deutlich höhere Bindung aufweisen als die Makromoleküle von "nicht-responsiven" D2-Mäusen. Auch die MC-vorbehandelte "nicht-responsive" D2-Maus läßt im Vergleich zu PB-vorbehandelten Tieren beider Stämme eine geringfügige Bindungszunahme erkennen. Die Lebern der PB-vorbehandelten Mäuse selbst zeigen gegenüber der Öl-Kontrolle einen Anstieg der irreversiblen Bindung, wobei sich die Werte der beiden Stämme nicht wesentlich unterscheiden.

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten

Abbildung 12 zeigt die Elutionsprofile der Desoxyribonukleosidkomplexe von je einer Leber der "responsiven" bzw. "nicht-responsiven" Mäusestämme C57BL/6N und DBA/2N. Die Lebern der MC-vorbehandelten Tiere wurden 30 Minuten lang mit $2,5 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren perfundiert.

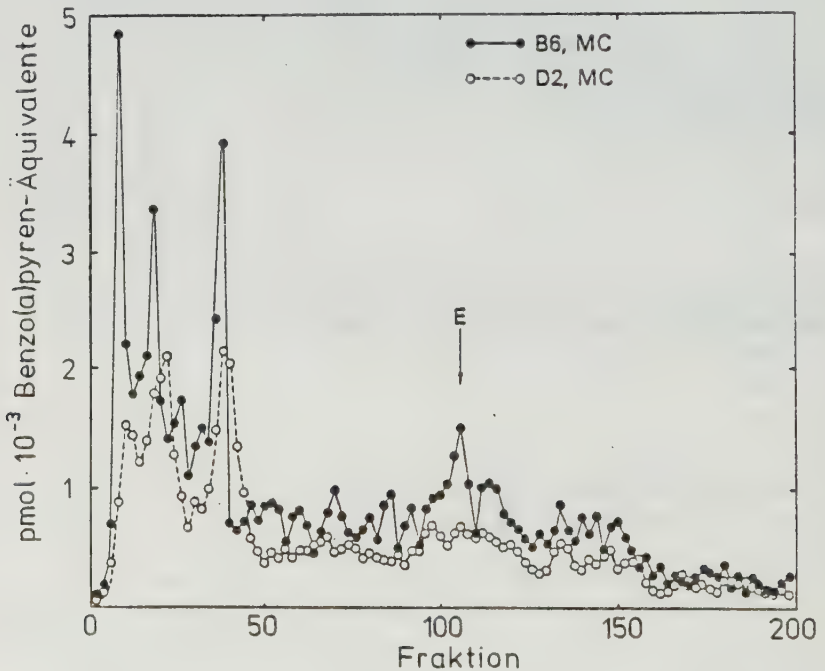


Abbildung 12. Elutionsprofile von hydrolysiertem DNA aus einzelnen Lebern MC-vorbehandelter Mäuse der Stämme C57BL/6N (B6) und DBA/2N (D2) nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 30 Minuten lang mit $2,5 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren perfundiert.

Bei der Leber der MC-vorbehandelten D2-Maus ist kein spezifischer Peak nachweisbar, der einem bekannten Addukt zugeordnet werden könnte. Dagegen ist bei der "responsiven" B6-Maus der Peak E sichtbar, der die Diolepoxid-Komplexe repräsentiert. Die gleichen Verhältnisse werden bei der Analyse der Ribonukleosidaddukte (Abbildung 13) gefunden.

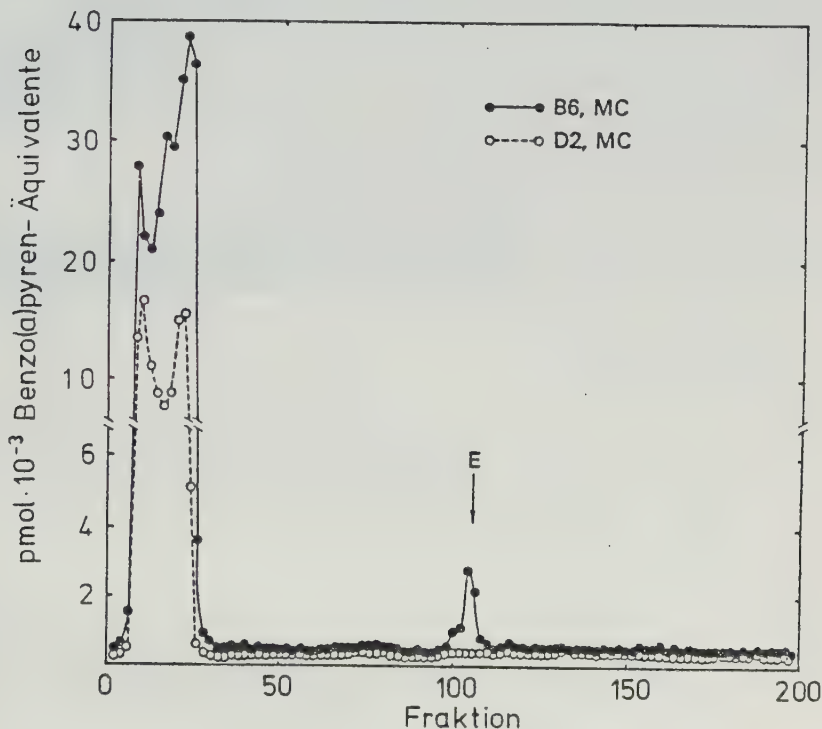


Abbildung 13. Elutionsprofile von hydrolysierter RNA aus einzelnen Lebern MC-vorbehandelter Mäuse der Stämme C57BL/6N (B6) und DBA/2N (D2) nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die isolierten Organe wurden 30 Minuten lang mit 2,5 μ M Benzo(a)pyren perfundiert.

Experiment F: Mäuselungen-Schnitte

Modifikation der irreversiblen Bindung bei genetisch "responsiven" und "nicht-responsiven" Mäusestämmen

Um mit der Nukleinsäuremenge über die Nachweisgrenze der chromatographischen Adduktaufklärung zu gelangen, wurden an Stelle von Mäuselungenperfusionsen technisch leichtere Inkubationen mit Lungenschnitten durchgeführt, bei denen die Lungen von je 10-30 unterschiedlich vorbehandelten Mäusen genetisch "responsiver" und "nicht-responsiver" Stämme Verwendung fanden. In jedem Ansatz wurden die Schnitte 120 Minuten mit $6,25 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren (5 mCi) inkubiert. Die Bindungswerte der zellulären Makromoleküle sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Irreversible Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten an zelluläre Makromoleküle von Lungenschnitten vorbehandelter Mäuse verschiedener Stämme

Ver- such	Stamm	Vorbe- hand- lung	DNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	RNA (pmol BP-Äquivalente/mg)	Protein (pmol BP-Äquivalente/mg)
1	B 6	MC	1,71	12,50	30,45
2	D 2	MC	0,27	1,14	15,52
3	B 6	PB	0,23	0,73	13,33
4	D 2	PB	0,13	0,71	7,55
5	B 6	Öl	0,68	1,40	15,83
6	D 2	Öl	0,12	0,91	9,54

Die Benzo(a)pyren-Konzentration im Inkubat betrug $6,25 \mu\text{M}$.

Für jeden der 6 Inkubationsansätze wurden die Lungenschnitte von 10 - 30 Tieren vereinigt.

Wie bei den entsprechenden Mäuseleber-Perfusionsversuchen (Experiment E) ergibt sich bei MC-vorbehandelten Tieren eine deutlich höhere Bindung an Makromoleküle von B6-Mäusen als an

Makromoleküle von D2-Mäusen. Nach Vorbehandlung mit PB als einem Induktor von Cytochrom P-450 werden niedrige Bindungsraten gefunden, was gut mit den Ergebnissen von Rattenlungenperfusionen (Experiment C) übereinstimmt. Auffällig ist die verhältnismäßig hohe Bindung an Makromoleküle Öl-behandelter B6-Mäuse, die nicht erklärt werden kann.

Vergleich der Bindungswerte in Lungenschnitten und perfundierten Lungen

Bei einem ergänzenden Versuch wurden 4 Lungen von MC-vorbehandelten B6-Mäusen volumenkonstant (1,5-2 ml/min) je 30 Minuten lang mit $2,5 \mu\text{M}$ ^3H -Benzo(a)pyren (5 mCi) im üblichen Medium perfundiert. Dabei wurden jeweils 2 Lungen mit nur einem Perfusionsmedium perfundiert, wobei die Vorperfusionszeit für die erste Lunge ungefähr 20 Minuten betrug. Die 4 Lungen besaßen nach der Perfusion ein Feuchtgewicht von je 140-200 mg und wurden zur Analyse vereinigt.

An gebundenen Benzo(a)pyren-Äquivalenten werden gefunden:

- 0,75 pmol/mg DNA,
- 7,13 pmol/mg RNA,
- 13,54 pmol/mg Protein.

Diese Werte stimmen gut mit denjenigen überein, die bei den Lungenschnitten erhalten werden (vgl. Versuch 1 in Tabelle 9), wenn man berücksichtigt, daß bei den Perfusionsversuchen die Konzentration des Benzpyrens um den Faktor 2,5 niedriger liegt als bei den Lungenschnitt-Versuchen.

Aufklärung des Nukleosidaddukt-Musters von Benzo(a)pyren-Metaboliten

Die Adduktmuster der Nukleoside von DNA und RNA aus Lungenschnitten von MC-vorbehandelten Mäusen des "responsiven" und des "nicht-responsiven" Stamms sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

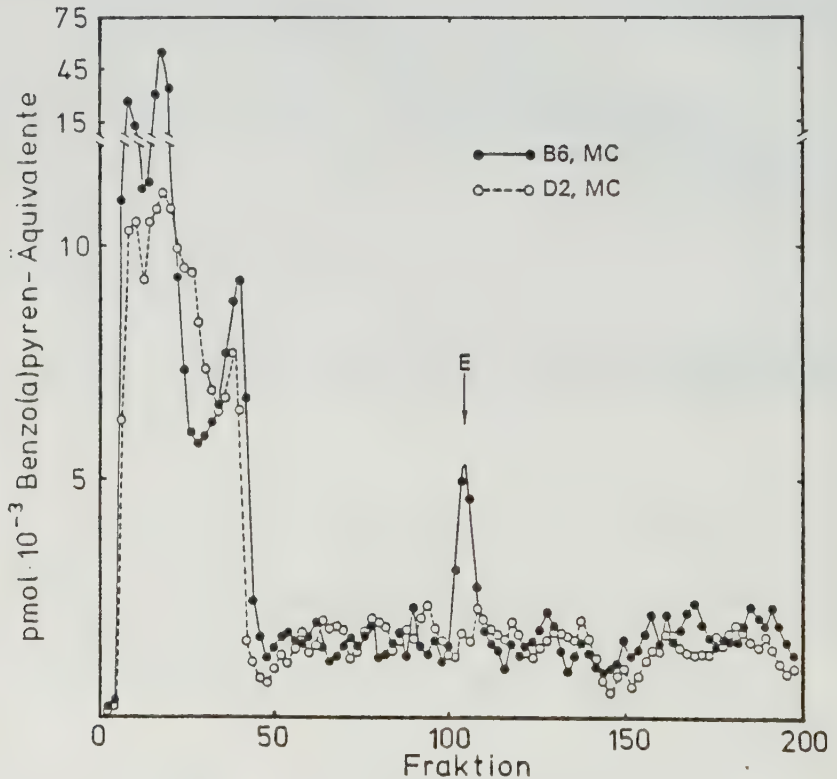


Abbildung 14. Elutionsprofile von hydrolysiertem DNA aus Lungenschnitten MC-vorbehandelter Mäuse der Stämme C57BL/6N (B6) und DBA/2N (D2) nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die Lungenschnitte wurden 120 Minuten lang mit $6,25 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren inkubiert.

Wie bei den perfundierten Mäuselebern (Experiment E) sind bei den Lungen-Nukleinsäuren MC-vorbehandelter "nicht-responsiver" Mäuse keine spezifischen Adduktpeaks aufzufinden, während bei den "responsiven" Mäusen jeweils der Peak E nachweisbar ist, der zur Hauptsache aus den Dielepoxidaddukten besteht.

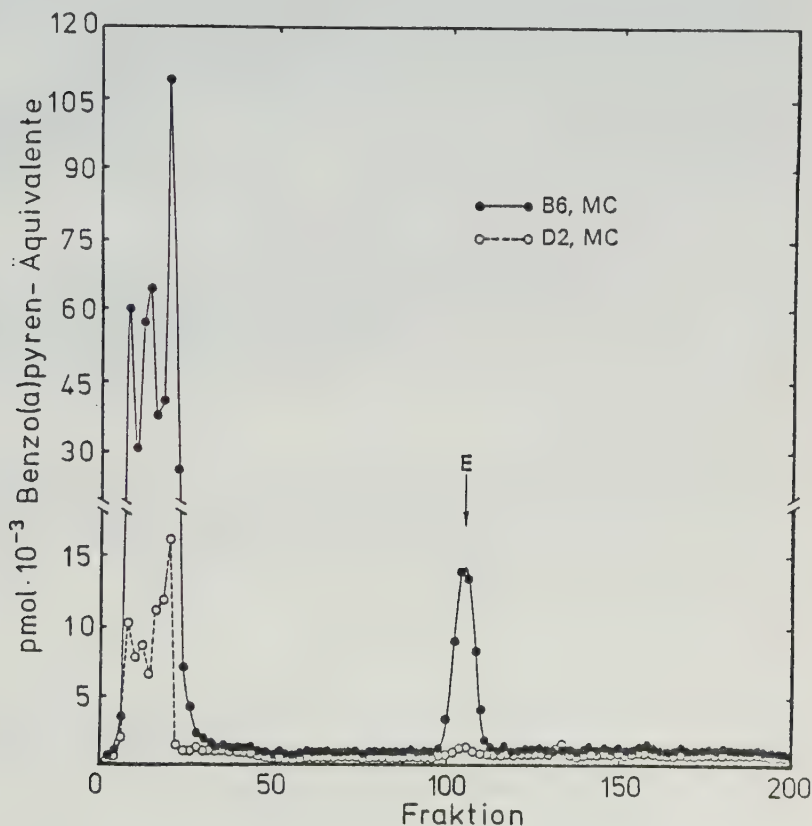


Abbildung 15. Elutionsprofile von hydrolysierter RNA aus Lungenschnitten MC-vorbehandelter Mäuse der Stämme C57BL/6N (B6) und DBA/2N (D2) nach Sephadex LH-20-Chromatographie. Die Lungenschnitte wurden 120 Minuten lang mit $6,25 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren inkubiert.

V. Diskussion

Die Diskussion der vorgelegten Befunde soll im wesentlichen auf die drei hauptsächlichen Fragen beschränkt werden:

- a) Inwieweit beeinflussen Induktoren und Inhibitoren der Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen und der Epoxidhydratase das Ausmaß der irreversiblen Benzo(a)pyren-Bindung an zelluläre Makromoleküle verschiedener Organe?
- b) Welche Benzo(a)pyrenmetabolit-Nukleosidaddukte werden unter den verschiedenen Bedingungen gebildet?
- c) Besteht eine Zeitabhängigkeit der kovalenten Bindung von Benzo(a)pyrenmetaboliten und des Addukt-Profiles?

a) Die ersten Leberperfusionen mit einem karzinogenen polyzyklischen Kohlenwasserstoff sind von TAKAHASHI et al. (1977) mit dem Ziel durchgeführt worden, den hepatobiliären Metabolismus von 3-Methylcholanthren (MC) aufzuklären. Die dort gewonnenen Ergebnisse sind nur zu einem kleinen Teil mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten direkt vergleichbar. Dennoch gibt es auffällige Übereinstimmungen vor allem bei der biliären Exkretion der Karzinogene, die nach Vorbehandlung mit den Cytochrom P-448-Induktoren MC bzw. GNF jeweils nach ca. 20-minütiger Perfusion ein Maximum besitzt (vgl. Abb. 7) und gegenüber Kontrollen um mehr als das Doppelte gesteigert ist (vgl. Abb. 5).

α -Naphthoflavin, das von den zitierten Autoren als potentieller Monooxygenase-Inhibitor zum Perfusat zugesetzt wurde, bewirkte allerdings keine Hemmung, sondern einen leichten Anstieg der biliären Ausscheidung von MC. Es kann deshalb angenommen werden, daß für die biliären Ausscheidungsprozesse weniger die Monooxygenasen als vielmehr die durch Phenobarbital bzw. durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe induzierbaren Glucuronyltransferasen (BOCK et al., 1977) kritisch sind.

Unsere Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber zeigen, daß die Vorbehandlung mit Enzyminduktoren nicht nur eine beschleunigte biliäre Ausscheidung des Karzinogens Benzo(a)-pyren (BP) bedingt, sondern daß die Vorbehandlung mit den Monooxygenase-Induktoren BNF und PB trotz vielfältig vorhandener Konjugationsmechanismen auch zu einem Anstieg der an zelluläre Biopolymere gebundenen Radioaktivität führt (Tab. 2). Allerdings ist der Induktionseffekt für DNA, RNA und Protein unterschiedlich. Schon bei den Kontrollen fallen Unterschiede der Bindungsrate zwischen DNA einerseits und RNA sowie Protein andererseits auf. Unter der Annahme, daß in 1 g Lebergewebe etwa 2 mg DNA enthalten sind (PRICE et al., 1950), kann für die Kontrollebern bei einem Lebergewicht von etwa 10 g eine Gesamtbindung von etwa 0,002 % des eingesetzten Benzo(a)pyrens ($\sim 5 \mu\text{mol}$; Experiment A) an die DNA nach 60-minütiger Perfusion errechnet werden. Demgegenüber werden ca. 1 % an das phenolextrahierbare Protein und 0,04 % an die RNA der Kontrollebern gebunden, wenn man einen Protein- bzw. RNA-Gehalt von etwa 130 bzw. 6 mg/g Lebergewebe zugrundelegt (PRICE et al., 1950). Nach Induktion von Cytochrom P-450 durch PB ebenso wie von Cytochrom P-448 durch BNF steigt die Bindung an DNA auf 0,01 % der angebotenen Menge des Karzinogens an, aber nur nach Vorbehandlung mit BNF als einem Induktor von Cytochrom P-448 nimmt die Bindung an RNA und Protein zu und erreicht dann 0,4 % bzw. 1,5 % der eingesetzten BP-Menge. Von den insgesamt gebundenen BP-Äquivalenten befinden sich so auch unter Kontrollbedingungen nur 0,2 % an der DNA, wobei noch der Betrag unterschritten wird, der von KUROKI und HEIDELBERGER (1971) für radioaktiv markiertes Methylcholanthren an Kulturen von Maus-Prostatazellen (Fibroblasten) gefunden wurde (1 %). Andererseits stimmt eine Bindung von ca. 20 pmol BP-Äquivalenten pro mg DNA nach Cytochrom P-448-Induktion mit Werten überein, die von JERNSTRÖM et al. (1976) bei in vitro-Experimenten erhalten wurden, als sie Leber-Zellkerne zusammen mit Lebermikrosomen bei vergleichbarer Substratkonzentration ($80 \mu\text{M}$) inkubierten. Bei

ähnlichen in vitro-Versuchen fanden PEZZUTO et al. (1976) allerdings eine etwa zehnfach höhere DNA-Bindung.

Die gezeigten quantitativen Bindungsunterschiede zwischen DNA, RNA und Protein lassen vermuten, daß die einzelnen Makromoleküle für die im endoplasmatischen Retikulum gebildeten reaktiven BP-Metaboliten in unterschiedlichem Ausmaß zugänglich sind. Obwohl möglicherweise auch ein in der Kernmembran befindliches Monooxygenasesystem bei der Aktivierung von BP-Metaboliten und deren Bindung an DNA eine Rolle spielt (ALEXANDROV und THOMPSON, 1977), muß doch angenommen werden, daß die Kern-DNA auch von den im endoplasmatischen Retikulum gebildeten reaktiven BP-Metaboliten direkt erreicht wird (JERNSTRÖM et al., 1976; PEZZUTO et al., 1976); allerdings dürften bei einem isoliert perfundierten Organ mit seinen intakten Membranen und Konjugationsmechanismen im Gegensatz zu den zitierten in vitro-Untersuchungen viel weniger Metaboliten einer Entgiftung oder einer Bindung an RNA bzw. Protein entgehen.

Die Bedeutung der Bindung eines Karzinogens an RNA oder Protein für die Tumorentstehung ist noch unklar. Die Annahme ist zwar weit verbreitet, daß gerade die kovalente Bindung an die DNA letztlich zur Kanzerogenese führt (BROOKES und LAWLEY, 1964), es könnten aber auch Mechanismen, die mit der Bildung von RNA- oder Protein-Komplexen zusammenhängen, in das Geschehen der Krebsentstehung verwickelt sein (PITOT und HEIDELBERGER, 1963). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Isolierung zellulärer Biopolymere erfaßt die einzelnen Makromolekül-Spezies nicht vollständig und ist zu einer Differenzierung nicht geeignet. Es wäre wünschenswert, in weiterführenden Arbeiten nicht nur andere Isolierungs-Methoden anzuwenden, sondern auch die Bindung an spezifische Proteine und an Nukleinsäuresubfraktionen zu untersuchen. Eines der meistuntersuchten löslichen Proteine ist Ligandin (LITWACK et al., 1971), das Steroide, Bilirubin, Karzinogene und exogene organische Anionen bindet und darüberhinaus eventuell zur Kern-DNA transportiert (DePIERRE und ERNSTER, 1978). Lohndend er-

scheint auch eine Untersuchung von Enzymen, die bei der Replikation und Transkription beteiligt sind, auf kanzerogenbedingte Modifikationen, ebenso wie die Prüfung verschiedener RNA-Spezies auf BP-Bindung. In der vorliegenden Arbeit wurden derartige Differenzierungen nicht vorgenommen; allerdings wurde die kovalente Bindung an mikrosomales Protein bestimmt (Tab. 1), und es zeigt sich, daß sich an mikrosomales Protein mehr als zehnmal so viel Radioaktivität pro mg Protein irreversibel bindet als an Gesamt-Leberprotein. Schwieriger zu verstehen ist dabei allerdings, daß nach Induktion der Cytochrome P-450 signifikant weniger an die Mikrosomenfraktion gebunden ist als bei Kontrollen.

Ebenso wie die Untersuchungen mit Induktoren der Cytochrome P-450 zeigen Versuche mit Hemmstoffen dieser Enzyme, daß auch in vivo das Monooxygenasesystem der Leber weitgehend verantwortlich für das Ausmaß der kovalenten Bindung an Zellbestandteile ist. Eine Inhibition der Monooxygenaseaktivität durch α -Naphthoflavin (α NF) senkt den Betrag der an DNA gebundenen Radioaktivität (Abb. 2), wie es von in vitro-Untersuchungen (JERNSTRÖM et al., 1976; PEZZUTO et al., 1976) und von Zelltransformationsexperimenten (MARQUARDT und HEIDELBERGER, 1972) bekannt ist. Auch der Inhibitor Metyrapon (MP) senkt die kovalente Bindung an die DNA. Eine differentielle Hemmung der GNF-induzierten und der PB-induzierten Bindung durch α NF bzw. MP (WIEBEL et al., 1971; GOUJON et al., 1972; ALEXANDROV und THOMPSON, 1977; KAHL et al., 1978) konnte allerdings mit der in diesem Fall geringen Anzahl von Versuchen, die zudem nur mit einer einzigen Inhibitor-Konzentration durchgeführt wurden, nicht beobachtet werden.

ALEXANDROV und THOMPSON (1977) zeigten, daß der Epoxidhydratase-Inhibitor TCPO in vitro eine Zunahme der kovalenten Bindung von Benzo(a)pyren an DNA bewirkt. Das ließ vermuten, daß die Epoxidhydratase in die Prozesse der Karzinogenese entgiftend eingreifen kann. An der isoliert perfundierten Rattenleber ist bei der TCPO-Konzentration von 0,5 mM keine statistisch auffällige Änderung der Bindungswerte feststellbar (Tab. 3). Dies stimmt mit der Vor-

stellung überein, daß nicht nur primäre Epoxide, sondern ebenso Diolepoxide, die als sekundäre Epoxide die Epoxidhydratase zu ihrer Bildung benötigen, für die kovalente Bindung verantwortlich sind. Es muß auch beachtet werden, daß in vivo selbst bei sublethaler Dosierung von TCPO keine Epoxidhydratase-Hemmung beobachtet worden ist; ob eine solche im perfundierten Organ überhaupt erreicht werden kann, ist nicht untersucht (DESCH et al., 1973).

Das Ausmaß der irreversiblen Bindung ist nicht nur vom Induktionszustand des Organs und dem Inhibitorzusatz, sondern auch von der BP-Konzentration abhängig. Mit steigendem BP-Angebot nimmt die gebundene Radioaktivität insbesondere bei der DNA nicht in gleichen Verhältnissen zu, wie anschaulich aus den Versuchsergebnissen mit perfundierten Mäuselebern (Tab. 7) hervorgeht. Während im Bereich niedriger Substratkonzentrationen ein Anstieg der Substratkonzentration um den Faktor 4 die Bindung an RNA bzw. Protein um den Faktor 3-4 steigert, kommt es an der DNA nur zu einer Bindungszunahme um den Faktor 1,3. Es ist anzunehmen, daß die Entgiftungsprozesse im endoplasmatischen Retikulum auch bei der höheren Substratkonzentration nicht erschöpft werden und weiterhin wenig reaktives Material die im Kern schwer zugängliche DNA erreicht. Bei einer Zunahme der Substratkonzentration um den Faktor 40 von $2,5 \mu\text{M}$ auf $100 \mu\text{M}$ ergibt sich für RNA und Protein eine Bindungszunahme um den Faktor 24, für DNA um den Faktor 14. Für die Rattenleber zeigt eine ähnliche Betrachtung der Perfusion BNF-behandelter Organe mit $100 \mu\text{M}$ BP (Tab. 2) bzw. $1 \mu\text{M}$ BP (Tab. 6, Versuch 6) für DNA und Protein ebenfalls ein Abweichen von der Linearität der Konzentrations-Bindungs-Kurve: die Zunahme der Konzentration um den Faktor 100 führt zu einer Zunahme der Bindung an DNA um den Faktor 56, an RNA um den Faktor 124 und an Protein um den Faktor 62.

Bei den mit einer BP-Konzentration von $2,5 \mu\text{M}$ durchgeführten Perfusionen von Lebern genetisch "responsiver" und "nicht-responsiver" Mäuse zeigt sich - den Versuchen an der Rattenleber entsprechend - ein starker Anstieg der irreversiblen Bindung an die DNA, wenn

Cytochrom P-448 induziert ist (Tab. 8). Dabei stimmt das Ausmaß der Bindung mit dem in der Rattenleber gut überein, wenn die Rattenleberperfusionen mit $1 \mu\text{M}$ Benzo(a)pyren (Tab. 6, Versuch 6) zum Vergleich herangezogen werden. Auch diese Versuche sprechen für die entscheidende Rolle der Monooxygenase bei der Entstehung von Läsionen an zellulären Makromolekülen. Im Unterschied zu den Ergebnissen an Ratten ist bei den Mäusen jedoch nach Vorbehandlung mit PB die kovalente Bindung deutlich weniger induziert als nach Vorbehandlung mit BNF, dem Induktor von Cytochrom P-448 (Tab. 8).

CARLASSARE et al. (1972) fanden bei einem in vivo-Versuch, bei dem sie 20 g schweren Mäusen $\sim 2 \mu\text{mol}$ BP per os gaben, daß 15 Stunden nach der Applikation 1 von 875000 DNA-Nukleotiden durch BP-Bindung modifiziert war. Es ist zu erwarten, daß zu diesem Zeitpunkt eine Enzyminduktion stattgefunden hat. Der von den Autoren angegebene Wert liegt zwischen den Werten, die sich für unsere Versuche nach 30-minütiger Perfusion mit $\sim 10 \mu\text{M}$ bzw. $\sim 100 \mu\text{M}$ BP überschlagsmäßig errechnen lassen (wenn angenommen wird, daß in 1 mg DNA 10^{18} Nukleotide enthalten sind); danach ergeben sich Modifikationen im Verhältnis 1:1361000 bzw. 1:129000 Nukleotiden.

Die Inkubationen von Lungenschnitten "responsiver" und "nicht-responsiver" Mäuse mit $6,25 \mu\text{M}$ BP sowie die Lungenperfusionen bei den "responsiven" Mäusen mit $2,5 \mu\text{M}$ BP (Experiment F) ergeben hinsichtlich der Menge an kovalent gebundenem Karzinogen den Befunden an der Rattenlunge vergleichbare Resultate. Das Ausmaß der Bindung folgt wieder dem Induktionsgrad von Cytochrom P-448. Daß dabei der Wert der Lungen Öl-behandelter "responsiver" Kontrolltiere durch eine auffällig hohe Bindungsrate herausfällt, könnte auf einem Versehen bei der verwendeten Öl-Charge beruhen, könnte aber auch eine Präinduktion von Cytochrom P-448 durch hochpotente Induktoren widerspiegeln, die im gleichen Tierstall für Versuche an anderen Tiergruppen verwendet wurden (Tetrachlordibenzo-p-Dioxin).

Ein direkter Vergleich der Bindungswerte zwischen Lunge und Leber ist bei der Ratte nur für den Fall der BNF-Induktion möglich. Hier liegen sowohl für Leber (Tab. 6, Versuch 6) als auch für Lunge

(Tab. 6, Versuch 8) Ergebnisse aus einstündigen Perfusionen mit $1 \mu\text{M}$ BP vor, während bei Kontrollen und nach Phenobarbitalinduktion nur Leberperfusionen mit $100 \mu\text{M}$ durchgeführt wurden. Für die direkt vergleichbaren Versuche nach BNF-Induktion ergibt sich, daß etwa gleiche Mengen von BP-Metaboliten an Lungen- und Lebernukleinsäuren gebunden werden (pro mg DNA bzw. RNA). Wenn man einen möglichen, während der einstündigen Perfusion aber wahrscheinlich nicht ausgiebigen Tritiumaustausch vernachlässigt, kann man errechnen, daß nach Induktion von Cytochrom P-448 in beiden Organen eines von 10^6 bis 10^7 Basenpaaren der DNA am Ende einer 60-minütigen Perfusion mit $1 \mu\text{M}$ BP modifiziert ist. Die Markierung der Proteinfraction ist nach BNF-Induktion in der Lunge sogar deutlich höher als in der Leber.

Vergleicht man die Induktion der Bindung in Rattenleber und -lunge (Tab. 2 und Abb. 8a-c), so fällt vor allem auf, daß die Induzierbarkeit der Lunge durch BNF mit dem Faktor 15-23 viel höher liegt als bei der Leber, bei der nur ein Faktor von 2-11 erreicht wird. Dies steht in Übereinstimmung mit der von SEIFRIED et al. (1977) angegebenen hohen Induzierbarkeit von Mäuse-Lungenmikrosomen durch Vorbehandlung mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, liegt aber deutlich über den von VÄHÄKANGAS et al. (1979) gefundenen Werten für Rattenlungenmikrosomen (Faktor 4) und für isoliert perfundierte Rattenlungen (Faktor 6). Nach Vorbehandlung mit dem Cytochrom P-450-Induktor PB ergibt sich ebenfalls ein leichter Anstieg der Bindung, der aber im Gegensatz zur Leber auch bei der DNA nicht statistisch signifikant ist. Auch von VÄHÄKANGAS et al. (1977) wurde berichtet, daß die Benzpyrenhydroxylase der Lunge nicht durch PB induzierbar ist.

Stellt man die unterschiedliche Induzierbarkeit in Leber und Lunge der Ratte in Rechnung und führt den Vergleich des absoluten Modifikationsgrades der DNA in beiden Organen mit dieser Grundlage weiter, so läßt sich schätzen, daß bei unbehandelten Ratten und gleicher BP-Konzentration im Perfusionsmedium die Leber-DNA mehr BP-Metaboliten kovalent bindet als die Lungen-DNA. Bei der Maus, bei

der Leberperfusionsexperimente mit $2,5 \mu\text{M}$ BP (Tab. 8) mit Lungenschnittinkubationen in Gegenwart von $6,25 \mu\text{M}$ BP (Tab. 9) annähernd vergleichbar sind, ist auch bei der unbehandelten "nicht-responsiven" Maus (und auch bei der phenobarbitalinduzierten "nicht-responsiven" Maus) kein Unterschied in den absoluten Bindungswerten an DNA und RNA zwischen der Leber und Lunge nachweisbar. Die Ergebnisse nach Induktion von Cytochrom P-448 bestätigen die Befunde an der Ratte. Im Fall der MC-induzierten "responsiven" Maus können auch die Ergebnisse der Lungenperfusion mit $2,5 \mu\text{M}$ BP (Seite 59) direkt zum Vergleich herangezogen werden. Auch hier zeigt sich eine ähnliche Bindungsrate für DNA und RNA aus Leber einerseits und Lunge andererseits; wieder ist die Proteinfraction in der Lunge stärker markiert als in der Leber.

Dieser Befund war angesichts der deutlich geringeren Monooxygenaseaktivität von Lungenmikrosomen gegenüber Lebermikrosomen (SEIFRIED et al., 1977) unerwartet. Es kann angenommen werden, daß die höhere Entgiftungskapazität der Leber ihre höhere Aktivierungskapazität ausbalanciert; die im Vergleich zur Lunge geringe Bindung an Proteine könnte die hohe Aktivität von entgiftenden Monooxygenase-Konjugationsreaktionen am Entstehungsort der reaktiven Metaboliten, im endoplasmatischen Retikulum, widerspiegeln. Die hohe Monooxygenaseaktivität der Leber schien bisher in einer gewissen Diskrepanz zu der Tatsache zu stehen, daß sie im Gegensatz zur Lunge kein Zielorgan der karzinogenen BP-Wirkung ist. Die hier beschriebenen Befunde, die zeigen, daß die hohe Monooxygenaseaktivität nicht mit einer vermehrten Bindung an DNA einhergehen muß, entschärfen diesen Widerspruch.

In vivo kann Benzo(a)pyren die Lunge nicht nur durch Zirkulation im Blut, sondern vor allem durch Inhalation erreichen. Da sich im Respirationstrakt über 40 verschiedene Zelltypen befinden (diskutiert in MASS und KAUFMAN, 1978), die experimentell nur schwer zugänglich sind und deren Induzierbarkeit und Rolle bei der Entstehung von Lungentumoren sich unterscheiden, ist die Bedeutung einer systemischen Monooxygenase-Induktion für die chemische Karzinogenese im Zielorgan Lunge nur schwer abschätzbar. BNF steigert

zwar bei den Organperfusionen deutlich die metabolische BP-Aktivierung, führte aber andererseits zu einer verminderten BP-Tumoranfälligkeit von Lunge und Haut (WATTENBERG und LEONG, 1970), und auch bei anderen Induktoren wurde eine eindeutige Korrelation zwischen Monooxygenaseinduktion einerseits und durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe ausgelöstem Krebs andererseits nicht gefunden (BENEDICT et al., 1973). Die vorherrschende Rolle der Leber bei der Metabolisierung von Fremdstoffen einschließlich der Karzinogene mag dazu führen, daß ein gewisser Teil der von ihr gebildeten reaktiven BP-Metaboliten auf systemischem Weg zur Lunge gelangt und dort kovalent bindet. Andererseits ist es vorstellbar, daß gerade eine induzierte Leber eine mehr entgiftende Funktion ausübt und so nur ein sehr kleiner Betrag von reaktivem Material, sei es in freier, sei es in konjugierter Form, das Organ verlassen kann. Die Ergebnisse der zur Klärung dieser Fragen angestellten Untersuchungen (Experiment D) scheinen darauf hinzudeuten, daß - zumindest unter den angegebenen Versuchsbedingungen - in der Tat die Leber eine Entgiftungsfunktion für eine im gleichen Perfusionskreislauf befindliche Lunge ausübt. In allen Fällen erhielt man bei Einschalten einer Leber in das System geringere Bindungswerte an die drei untersuchten Makromolekülspezies in der Lunge als in Abwesenheit einer Leber, und zwar besonders dann, wenn es sich um eine BNF-induzierte Leber handelte (Tab. 6). Ein direkter Vergleich der Befunde mit und ohne Leber im System ist zwar deshalb nicht möglich, weil im kombinierten System 30 Minuten lang, bei der Lungenperfusion 60 Minuten lang perfundiert wurde; jedoch weisen die Ergebnisse zum Zeitverlauf der Bindung in der Leber (Abb. 8a-c) darauf hin, daß bei der Lungenperfusion ohne eingeschaltete Leber die Bindungswerte nach 30 Minuten eher noch höher gewesen sein könnten als nach 60 Minuten, so daß sich dann der Schutzeffekt der Leber noch deutlicher abheben würde.

b) Durch die Analyse der Nukleosidaddukte von BP-Metaboliten an den DNA- und RNA-Fractionen der isoliert perfundierten Organe ist es möglich, weitere Anhaltspunkte über das Wechselspiel von ent-

giftenden und aktivierenden Reaktionen verschiedener Monooxygenasen und der konjugierenden Folgereaktionen auf der Ebene der intakten Zelle zu erhalten. Zunächst sollen die Verhältnisse für die aus den Lebern isolierten Nukleinsäurefraktionen betrachtet werden.

Es ist bekannt, daß ein oder mehrere 7,8-Diol-9,10-epoxid(e) als Folgeprodukte des (-)trans-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrens (7,8-Diols) hauptverantwortlich sind für die kovalente Bindung an DNA in vivo (SIMS et al., 1974; OSBORNE et al., 1976; JEFFREY et al., 1977) und die mutagene Wirkung (WOOD et al., 1976; HUBERMAN et al., 1976) des Benzo(a)pyrens. Während die Menge des durch Lebermikrosomen nach PB-Induktion gebildeten 7,8-Diols keinen nennenswerten Betrag im Vergleich zu der nach der Induktion mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen gebildeten Menge ausmacht (HOLDER et al., 1975), wird die gesamte kovalente Bindung von BP-Metaboliten an die DNA bei der Ratte durch beide Vorbehandlungsarten erheblich gesteigert (Tab. 2). Es mußte daher angenommen werden, daß für die Bindung nach PB-Induktion andere Metaboliten eine Rolle spielen.

Bei der hydrolysierten DNA von Rattenlebern (Abb. 3) werden bei den Kontrollen außer in den Anfangsfraktionen der eluierten Säule bis Fraktion 50 keine Radioaktivitätsanhäufungen in einzelnen Fraktionen sichtbar. Dagegen fällt nach BNF-Vorbehandlung ein deutliches Muster verschiedener BP-Metabolit-Nukleosidaddukte auf. Den Peaks E bis H sind hinsichtlich des BP-Anteils sehr wahrscheinlich die folgenden Metaboliten zuzuordnen: Peak E dürfte einem oder mehreren 7,8-Diol-9,10-epoxid(en), F dem 7,8-Oxid und/oder einem durch Sekundärmetabolismus entstehenden Chinonderivat, G dem 4,5-Oxid und H Oxidationsprodukten von BP-Phenolen, unter anderem dem 9-OH-Benzpyren-4,5-oxid, entsprechen (BOOBIS et al., 1978).

Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital fand sich, abgesehen von der hohen Radioaktivität bis zur Fraktion 50, nur der Peak G, der dem 4,5-Oxid des Benzpyrens entsprechen dürfte. Dieser Befund stimmt

Überein mit der Zunahme von Cytochrom P-450 im engeren Sinne nach Phenobarbitalgabe und der bevorzugten Bildung des K-Region-Oxids des Benzpyrens durch diese Cytochrom P-450-Form (diskutiert in THORGEIRSSON und NESERT, 1977).

Beachtlich scheint bei allen drei Gruppen die hohe Radioaktivität in den ersten Fraktionen bis zur Fraktion 50, die etwa 50-70 % der gesamten eluierten Radioaktivitätsmenge ausmacht. In diesem Anteil könnten sich noch biologisch relevante Anteile von BP-Addukten befinden (PELKONEN et al., 1978), so nicht vollständig hydrolysierte Oligonukleoside oder Phosphotriester; jedoch könnte sich hier auch metabolisch in die nicht modifizierte DNA inkorporiertes Tritium manifestieren (zur Diskussion der Radioaktivität in den frühen Fraktionen siehe EASTMAN und BRESNICK (1979)).

Bei der DNA perfundierter Mäuselebern (Abb. 12) und von -lungenschnitten (Abb. 14) ist nur bei "responsiven" Mäusen und dort auch nur nach Vorbehandlung mit einem Cytochrom P-448-Induktor ein spezifischer Peak (E) nachweisbar, der dem Diolepoxidaddukt entspricht. Von der DNA perfundierter Rattenlebern, die einer höheren BP-Konzentration ($\sim 100 \mu\text{M}$) ausgesetzt waren als die perfundierten Mäuselebern ($2,5 \mu\text{M}$), und von der mehr Material auf die Säule gepackt werden konnte, werden drei zusätzliche Peaks (F, G und H) gefunden, wenn die Ratten mit einem Cytochrom P-448-Induktor vorbehandelt sind. Das 4,5-Oxid-Addukt, das sich im Peak G manifestiert, wurde bisher bei in vivo-Untersuchungen an einer Reihe von Geweben - unabhängig von den Induktionsbedingungen - noch nie nachgewiesen, erscheint aber bei der BNF-induzierten perfundierten Rattenleber. In vitro wurde erst neuerdings das Auftreten des Peak G nach Induktion von Cytochrom P-448 von VÄHÄKANGAS et al. (1979) gezeigt, als sie exogene DNA mit Benzo(a)pyren und Rattenlungenmikrosomen MC-vorbehandelter Tiere inkubierten; bei dem entsprechenden Versuch mit Rattenlebermikrosomen konnte kein 4,5-Oxid nachgewiesen werden. Die Autoren schlagen als eine Erklärung für diesen Befund vor, daß bei einem sehr großen Verhältnis Substrat/Enzym das 4,5-Oxid in Mengen, die von der Epoxidhydratase nicht

mehr verarbeitet werden können, gebildet und damit für die kovalente Bindung an DNA verfügbar wird. Eine andere Deutung der Autoren geht von der Beobachtung aus, daß in Lungenmikrosomen im Vergleich zu Lebermikrosomen relativ wenig Epoxidhydratase vorhanden ist, so daß die Bildung des 4,5-Dihydrodiols erschwert ist.

Die Hauptbestandteile des Peak H sind Oxidationsprodukte von BP-Phenolen, die zwar in vitro vorherrschen, wenn BP von Lebermikrosomen Cytochrom P-448-induzierter Tiere aktiviert wird (THOMPSON et al., 1976; NEBERT et al., 1977; PELKONEN et al., 1976), in vivo aber wegen der vielfältigen Konjugationsprozesse, die die Phenole schnell entfernen, weniger leicht erscheinen. Das 9-OH-Benzpyren-4,5-oxid, von dem angenommen wird, daß es an der Ausbildung von Peak H in besonders hohem Maße beteiligt ist (PELKONEN et al., 1978; KING et al., 1976), gilt in vitro als ein gutes Substrat sowohl für Glucuronidierung (NEMOTO und GELBOIN, 1976) als auch für Sulfatierung (COHEN et al., 1976; COHEN et al., 1977). In vivo ist auch dieses Addukt - ebenso wie das 4,5-Oxid-Addukt - bisher nicht beobachtet worden, läßt sich jedoch in der perfundierten Rattenleber und -lunge nach BNF-Vorbehandlung deutlich nachweisen (Abbildungen 3, 9 und 11). Während Kontrolltiere und PB-vorbehandelte Ratten die BP-Phenole vollständig zu eliminieren scheinen, könnte die Konzentrationssteigerung dieser Metaboliten durch BNF-induziertes Cytochrom P-448 die Konjugationskapazität der Zelle überschreiten.

Bei der Adduktanalyse von DNA aus perfundierten Rattenlungen von BNF-behandelten Tieren (Abb. 11) ergeben sich 5 distinkte Peaks, von denen die Peaks E und H wesentlich größer sind als die Peaks F und I, die hauptsächlich auf Sekundärmetaboliten von BP-Chinonen zurückgehen (BOOBIS et al., 1978). Die chemische Natur des sehr großen Peaks, der nach 200 Fraktionen von der Säule eluiert wird, ist nicht bekannt; dieser Peak ist bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Während VÄHÄKANGAS et al. (1979) bei Lungenperfusion MC-vorbehandelter Ratten mit Benzo(a)pyren ebenfalls einen großen Peak E finden, ist bei diesen Autoren der den Oxidationsprodukten von BP-Phenolen zugeschriebene Peak H nicht vorhanden;

nur bei Inkubationsversuchen mit Lungenmikrosomen und exogener DNA tritt dieses Addukt ebenfalls auf. Der Grund für diese Unterschiede ist noch unklar.

Die BP-Konzentration, der die menschliche Bevölkerung ausgesetzt ist, ist noch wesentlich geringer als die bei den Lungenperfusionen verwendete. Nach LINDNER (1974) nimmt der Mensch täglich bis zu 3 µg Benzo(a)pyren auf, nach SCHMIDT und FRITZ (1968) liegt die während eines ganzen Lebens aufgenommene Gesamtmenge ungefähr bei 10 mg. Es wird angenommen, daß bei so niedrigen Substratkonzentrationen zwar der Gesamtbetrag der kovalent an DNA gebundenen BP-Metaboliten sehr gering ist, die Menge der in einem zweiten Schritt oxidierten Sekundärmetaboliten aber so hoch sein wird wie die gesamte verfügbare Karzinogenmenge (HOLDER et al., 1975). Dadurch wäre die Bildung von Peak E, der als relevant für die Karzinogenese gilt, begünstigt, aber auch die der Peaks F und H. Der einzige adduktbildende Metabolit, der nur einmal vom Cytochrom P-450 monooxygeniert wird, ist das K-Region-Epoxid, das zum Peak G führt; seine Bildung könnte nach der skizzierten Vorstellung bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen relativ weniger ins Gewicht fallen als die der sekundären Epoxide.

Auffällig in der Analyse der RNA-Proben aus Rattenlebern (Abb. 4) beim Vergleich mit der DNA ist das Fehlen der Peaks G und H nach Induktion von Cytochrom P-448. Bei der Nicht-Bindung der zugehörigen Metaboliten könnte es sich angesichts des Vorhandenseins von Uridin anstelle von Thymin um ein stereospezifisches Problem handeln. Während bei der RNA der Kontrolleber drei spezifische Peaks sichtbar sind, ist kein Peak bei der PB-vorbehandelten Leber vorhanden, was wiederum auf die Zunahme der Konjugationsleistung nach Induktion hindeutet.

Bei MC-behandelten "responsiven" Mäusen ist ebenso wie bei der DNA auch bei der RNA aus perfundierten Lebern (Abb. 13) und aus Lungenschnitten (Abb. 15) jeweils nur der Peak E sichtbar, während bei den "nicht-responsiven" Mäusen kein spezifischer Peak auftritt.

Die Ergebnisse vermitteln Vorstellungen über die Rolle spezifischer Formen der Monooxygenase für die Aktivierungsreaktionen *in vivo*. Darüber hinaus erhärten sie angesichts der langen Inkubationszeit für die Gewinnung der Nukleoside zur säulenchromatographischen Analyse die vorgeschlagene Interpretation einer irreversiblen bzw. kovalenten Bindung von BP-Metaboliten. Das unterschiedliche Muster von Nukleosidaddukten fügt sich in die *in vitro*-Befunde zum Metabolismus von BP durch die Cytochrome P-448 und P-450 ein (HOLDER et al., 1975; SEIFRIED et al., 1977). Die hier vorgelegten Befunde haben bestätigt, daß der am stärksten ins Gewicht fallende BP-Metabolit-Nukleosidkomplex, der unter *in vivo*-Bedingungen gebildet wird, mit kovalent gebundenen 7,8-Diol-9,10-epoxiden gebildet wird, die ihrerseits als die am stärksten mutagen und kanzerogen wirkenden BP-Metaboliten gelten. Diese Befunde führen zu einem Dilemma im Hinblick auf die Bedeutung der Diolepoxide für die chemische Karzinogenese, da nicht nur ein Zielorgan wie die Lunge, sondern auch die nicht als anfällig für die karzinogene Wirkung von BP geltende Leber den Peak E als größten Peak der aufgetrennten Nukleosidaddukte von DNA und RNA besitzt. VÄHÄKANGAS et al. (1979) teilten eine Reihe von daraus resultierenden Überlegungen mit, nach denen beispielsweise die BP-induzierte Kanzerogenese nicht direkt von der Menge der an DNA kovalent gebundenen Diolepoxide abzuhängen braucht oder nach denen weder DNA noch RNA die für die Krebsentstehung verantwortlichen zellulären Zielmoleküle darstellen müssen. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenhang ist die unterschiedliche Persistenz der Addukte.

c) Zur Persistenz der in verschiedenen Geweben unter *in vivo*-Bedingungen aufgefundenen Diolepoxidaddukte liegt in der Literatur eine Reihe von Befunden vor. SHINOHARA und CERUTTI (1977) zeigten an kultivierten Hamsternierenzellen und Mausembryofibroblasten, daß die beiden in ihren Systemen nachweisbaren diastereomeren Addukte (aus Guanin und der syn- bzw. anti-Form des Diol-epoxids) exzidiert werden können, wenn auch mit geringer Geschwin-

digkeit: erst nach 72 Stunden waren etwa 80 % der Addukte eliminiert worden. SAIRD und DIAMOND (1977) fanden, daß die beiden Dirolepoxidaddukte in Hamsterembryozellen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit repariert werden: das anti-Isomere wies in ihren Experimenten eine höhere Persistenz auf; dies ist auch die Form, die in Säugerzellen stärker mutagen ist (WOOD et al., 1976). IVANOVIC et al. (1978) fanden mehr als zwei Addukte mit dem Dirolepoxid in Hamsterembryozellen und konnten für alle eine Reparatur nachweisen. Phenoloxidaddukte tauchten in diesen Modellen nicht auf, lassen sich aber sowohl bei der perfundierten Leber (Experimente A und B) als auch bei der perfundierten Lunge (Experiment C) in beträchtlichem Ausmaß nachweisen (Peak H in Abbildungen 3, 9 und 11). Es erscheint vorstellbar, daß die Phenoloxidaddukte in den Frühphasen der Beobachtung, wie sie bei Organperfusionen vorliegen, deshalb eine größere Rolle spielen, weil sie schneller exzidiert werden können. Unterstützt wird diese Ansicht durch den Befund von NORDENSKJÖLD et al. (1978), daß in menschlichen Fibroblasten DNA-Strangbrüche nach Inkubation mit Benzpyren-7,8-dihydrodiol weitaus langsamer repariert werden als Strangbrüche nach Verabreichung von 9-Hydroxybenzo(a)pyren, bei denen die Reparatur innerhalb von 2 Stunden erfolgt.

Die irreversible Bindung von BP-Metaboliten an die DNA perfundierter Rattenlebern steigt bei einer Perfusion mit $\sim 0,7 \mu\text{M}$ BP während der ersten 15 Minuten an; danach nimmt die Bindung bereits in der ersten Perfusionsstunde wieder deutlich ab (Abb. 8a). Das Bindungsmaximum bei 15 Minuten spiegelt sich auch in den Elutionsprofilen (Abb. 9) wider, bei denen zum Zeitpunkt 15 Minuten mehr in den Fraktionen 100-200 eluierte Radioaktivität gefunden wird als zu den Perfusionszeitpunkten 5 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten. Das Dirolepoxidaddukt und das Phenoloxidaddukt machen beide diesen Zeitverlauf mit, jedoch scheint das Phenoloxidaddukt (Peak H) schneller eliminiert zu werden als das Dirolepoxidaddukt (Peak E). Ob diese Adduktkinetik allerdings wirklich als Reparaturprozeß zu interpretieren ist, wird durch das Verhalten der ir-

reversiblen Bindung an RNA und Protein in Frage gestellt (Abbildungen 8b und 8c). Diese Fraktionen weisen ganz ähnliche Zeitverläufe auf wie die DNA, und auch die Ribonukleosidaddukt-Konzentration folgt diesem Verlauf (Abb. 10). Es ist denkbar, daß die chemische Modifikation eine leichtere Angreifbarkeit von RNA und Protein durch die diese Makromoleküle abbauenden Enzyme bewirkt und damit ihre Halbwertszeit verkürzt. IVANOVIC et al. (1978) hatten allerdings in ihren Versuchen an Hamsterembryozellen keine Hinweise für einen reparaturartigen Prozeß für die RNA-Diolepoxidaddukte gefunden. Andererseits könnten aber auch möglicherweise nicht-kovalent gebundene Metaboliten, die auf der Sephadex LH-20-Säule ähnlich eluieren sollen wie die entsprechenden Addukte (KING et al., 1979), interferieren, so daß die Stoffwechselkinetik der Zelle miterfaßt wäre.

VI. Zusammenfassung

Am Modell der isoliert perfundierten Leber und Lunge von Ratten und solchen Mäusestämmen, bei denen die Induzierbarkeit von Cytochrom P-448 genetisch fixiert ist, sowie an Lungenschnitten dieser Mäusestämme wurden Untersuchungen zur irreversiblen Bindung von ^3H -Benzo(a)pyren durchgeführt. In vitro-Untersuchungen anderer Autoren haben gezeigt, daß nach Induktion des Monooxygenasesystems vermehrt metabolisch aktiviertes Benzo(a)pyren an zelluläre Makromoleküle gebunden wird. In den vorliegenden semi-in-vivo-Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Bei Perfusion von Ratten- wie von Mäuselebern ergibt sich ein Anstieg der irreversiblen Bindung von Benzo(a)pyrenmetaboliten an allen drei Makromolekülfractionen (DNA, RNA und Protein) nach Induktion von Cytochrom P-448; die Bindung an DNA nimmt auch nach Induktion von Cytochrom P-450 zu. Durch den Einsatz von Monooxygenase-Inhibitoren läßt sich die Bindung senken.
2. Bei Leberperfusionen wird ein verhältnismäßig hoher Anteil des eingesetzten Benzo(a)pyrens durch die Galle ausgeschieden. Die biliäre Ausscheidung ist nach Induktion des Monooxygenasesystems gesteigert.
3. Das Ausmaß der kovalenten Bindung von Benzo(a)pyren-Metaboliten nimmt in der perfundierten Leber mit steigender Benzo(a)pyren-Konzentration zu. Außerdem existiert eine Abhängigkeit von der Perfusionszeit. Bei der Rattenleber ergibt sich ein Bindungsmaximum nach einer Perfusionsdauer von 15 Minuten; danach kommt es bereits zu einem Rückgang der Bindung.
4. Die Bindung an Lungen-Biopolymere nimmt nur nach Induktion von Cytochrom P-448 zu und erreicht dann durch höhere Induktionsfaktoren Werte, wie sie auch in der Leber nach Induktion von Cytochrom P-448 gefunden werden. Ein Anstieg der DNA-Bindung nach Induktion von Cytochrom P-450, wie er bei der perfundierten Leber gefunden wurde, tritt bei der Lunge nicht auf.

5. Die Ergebnisse von Versuchen im kombinierten Perfusionssystem Rattenleber-Rattenlunge lassen vermuten, daß die Leber für die Lunge eine eher entgiftende Funktion hinsichtlich systemisch vorliegenden Benzo(a)pyrens ausübt, und zwar gerade dann, wenn die Lebermonooxygenaseaktivität induziert ist.

6. Die Nukleosidaddukt-Profile zeigen, daß in Leber und Lunge von Ratte und Maus nach Induktion von Cytochrom P-448 das DNA- und RNA-Addukt des Benzo(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxids gebildet wird. Darüber hinaus werden in der Rattenleber nach Induktion von Cytochrom P-448 und P-450 und in der Rattenlunge nach Induktion von Cytochrom P-448 weitere Addukte identifiziert, die bisher nur für in vitro-Bedingungen beschrieben waren, unter ihnen solche mit dem K-Region-Epoxid und mit Phenoloxiden des Benzo(a)pyrens.

7. Es läßt sich eine unterschiedliche Persistenz des Diolepoxidadduktes und der Phenoloxidaddukte während der ersten Perfusionsstunde nachweisen. Ob es sich dabei um Reparatur-Prozesse handelt, läßt sich noch nicht entscheiden.

Insgesamt lassen die Befunde erkennen, daß sich das Modell der isoliert perfundierten Organe dazu eignet, Versuchsergebnisse zu gewinnen, die zu einer Interpretation von Primärprozessen der chemischen Kanzerogenese beitragen können.

VII. Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, E.: Klinisch-pharmakologische Gesichtspunkte der Cytochrom P-450-abhängigen Biotransformation von Arzneimitteln. Pharmazie 33, 400-406 (1978)
- AHOKAS, J.T., PELKONEN, O., KÄRKI, N.T.: Metabolism of polycyclic hydrocarbons by a highly active aryl hydrocarbon hydroxylase system in the liver of a trout species. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 635-641 (1975)
- ALEXANDROV, K., THOMPSON, M.H.: Influence of inducers and inhibitors of mixed-function oxidases on benzo(a)pyrene binding to the DNA of rat liver nuclei. Cancer Res. 37, 1443-1449 (1977)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G.R., KUNTZMAN, R.: Differences in the kinetics of benzpyrene hydroxylation by hepatic drug-metabolizing enzymes from phenobarbital and 3-methylcholanthrene-treated rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 588-593 (1968)
- ALVARES, A.P., SCHILLING, G., LEVIN, W., KUNTZMAN, R.: Studies on the induction of CO-binding pigments in liver microsomes by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 521-526 (1967)
- BAIRD, W.M., BROOKES, P.: Isolation of the hydrocarbon-deoxyribonucleoside products from the DNA of mouse embryo cells treated in culture with 7-methylbenz(a)anthracene-³H. Cancer Res. 33, 2378-2385 (1973)
- BAIRD, W.M., DIAMOND, L.: The nature of benzo(a)pyrene-DNA adducts formed in hamster embryo cells depends on the length of time of exposure to benzo(a)pyrene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 162-167 (1977)

- BAIRD, W.M., HARVEY, R.G., BROOKES, P.: Comparison of the cellular DNA-bound products of benzo(a)pyrene with the products formed by the reaction of benzo(a)pyrene-4,5-oxide with DNA. *Cancer Res.* 35, 54-57 (1975)
- BENEDICT, W.F., CONSIDINE, N., NEBERT, D.W.: Genetic differences in aryl hydrocarbon hydroxylase induction and benzo(a)pyrene-produced tumorigenesis in the mouse. *Mol. Pharmacol.* 9, 266-277 (1973)
- BOCK, K.W., von CLAUSBRUCH, U.C., JOSTING, D., OTTENWÄLDER, H.: Separation and partial purification of two differentially inducible UDP-glucuronyltransferases from rat liver. *Biochem. Pharmac.* 26, 1097-1100 (1977)
- BOOBIS, A.R., ATLAS, S.A., NEBERT, D.W.: Carcinogenic benzo(a)-pyrene metabolites bound to DNA: metabolic formation by human cultured lymphocytes and by human liver microsomes. *Pharmacology* 17, 241-248 (1978)
- BOOBIS, A.R., NEBERT, D.W., FELTON, J.S.: Comparison of β -naphthoflavone and 3-methylcholanthrene as inducers of hepatic cytochrome(s) P-448 and aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity. *Mol. Pharmacol.* 13, 259-268 (1977)
- BOYLAND, E.: The biological significance of metabolism of polycyclic compounds. *Biochem. Soc. Symp.* 5, 40-54 (1950)
- BRODIE, B.B., AXELROD, J., COOPER, J.R., GAUDETTE, L., LA DU, B.N., MITOMA, C., UDENFRIEND, S.: Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science* 121, 603-604 (1955)
- BROOKES, P., LAWLEY, P.D.: Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202, 781-784 (1964)

- BROWN, R.R., MILLER, J.A., MILLER, E.C.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. IV. Dietary factors enhancing demethylation in vitro.
J. Biol. Chem. 209, 211-222 (1954)
- BURTON, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: Methods in enzymology, Vol XII, Part B (L. Grossman, K. Moldare, eds.), pp. 163-166. New York-London: Academic Press 1968
- CARPOVILA, J., PERRY, A.S., MORELLO, A., AGOSIN, M.: Some spectral properties of cytochrome P-450 from microsomes isolated from control, phenobarbital- and naphthalene-treated houseflies. Biochim. Biophys. Acta 314, 93-103 (1973)
- CARLASSARE, F., ANTONELLO, C., BACCICHETTI, F., MALFER, P.: On the binding of benzo(a)pyrene to DNA "in vivo".
Z. Naturforsch. 27 b, 200-202 (1972)
- CLAUDE, A.: A fraction from normal chick embryo similar to the tumor producing fraction of chicken tumor I.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 39, 398-403 (1938)
- COHEN, G.M., HAWS, S.M., MOORE, B.P., BRIDGES, J.W.: Benzo(a)pyren-3-yl hydrogen sulphate, a major ethyl acetate-extractable metabolite of benzo(a)pyrene in human, hamster and rat lung cultures. Biochem. Pharmac. 25, 2561-2570 (1976)
- COHEN, G.M., MOORE, B.P.: Metabolism of (³H)benzo(a)pyrene by different portions of the respiratory tract.
Biochem. Pharmac. 25, 1623-1629 (1976)
- COHEN, G.M., MOORE, B.P., BRIDGES, J.W.: Organic solvent soluble sulphate ester conjugates of monohydroxybenzo(a)pyrenes. Biochem. Pharmac. 26, 551-553 (1977)
- CONNEY, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.
Pharmacol. Rev. 19, 317-366 (1967)

- DALY, J.: Enzymatic oxidation at carbon. In: Handbuch der exp. Pharmakologie, Vol. XXVIII/2 (E.B. Brodie, J.R. GILLETTE, eds.), pp. 226-242. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1971
- DAS, M.L., ORRENIUS, S., ERNSTER, L.: On the fatty acid and hydrocarbon hydroxylation in rat liver microsomes. European J. Biochem. 4, 519-523 (1968)
- DAUDEL, P., DUQUESNE, M., VIGNY, P., GROVER, P.L., SIMS, P.: Fluorescence spectral evidence that benzo(a)pyrene-DNA products in mouse skin arise from diol-epoxides. FEBS Letters 57, 250-253 (1975)
- DePIERRE, J.W., ERNSTER, L.: The metabolism of polycyclic hydrocarbons and its relationship to cancer. Biochim. Biophys. Acta 473, 149-186 (1978)
- DIAMOND, L., DEFENDI, V., BROOKES, P.: The interaction of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene with cells sensitive and resistant to toxicity induced by this carcinogen. Cancer Res. 27, 890-897 (1967)
- DIEHL, H., SCHÄDELIN, J., ULLRICH, V.: Studies on the kinetics of cytochrome P-450 reduction in rat liver microsomes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1359-1371 (1970)
- EASTMAN, A., BRESNICK, E.: Persistent binding of 3-methylcholanthrene to mouse lung DNA and its correlation with susceptibility to pulmonary neoplasia. Cancer Res. 39, 2400-2405 (1979)
- ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O.: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem. Z. 338, 741-755 (1963)
- FERRIS, J.P., MacDONALD, L.H., PATRIE, M.A., MARTIN, M.A.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in the fungus Cunninghamella bainieri: evidence for the presence of cytochrome P-450. Arch. Biochem. Biophys. 175, 443-452 (1976)

- FJELLSTEDT, T.A., ALLEN, R.H., DUNCAN, B.K., JAKOBY, W.B.:
Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione.
J. Biol. Chem. 248, 3702-3707 (1973)
- GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and
pigment composition of different microsomal fractions.
Arch. Biochem. Biophys. 77, 493-509 (1958)
- GELBOIN, H.V.: A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene
to DNA.
Cancer Res. 29, 1272-1276 (1969)
- GELBOIN, H.V., HUBERMAN, E., SACHS, L.: Enzymatic hydroxylation
of benzopyrene and its relationship to cytotoxicity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 1198-1194 (1969)
- GELBOIN, H.V., WIEBEL, F., DIAMOND, L.: Dimethylbenzanthracene
tumorigenesis and aryl hydrocarbon hydroxylase in mouse skin:
inhibition by 7,8-benzoflavone.
Science 170, 169-171 (1970)
- GIELEN, J.E., GOUJON, F.M., NEBERT, D.W.: Genetic regulation of
aryl hydrocarbon hydroxylase induction. II. Simple mendelian
expression in mouse tissues in vivo.
J. Biol. Chem. 247, 1125-1137 (1972)
- GOUJON, F.M., NEBERT, D.W., GIELEN, J.E.: Genetic expression of
aryl hydrocarbon hydroxylase induction. IV. Interaction of
various compounds with different forms of cytochrome P-450
and the effect on benzo(a)pyrene metabolism in vitro.
Mol. Pharmacol. 8, 667-680 (1972)
- GRÄF, W., DIEHL, H.: Über den naturbedingten Normalpegel kanzerogener
polycyclischer Aromate und seine Ursache.
Arch. Hyg. 150, 49-59 (1966)
- GROVER, P.L., HEWER, A., SIMS, P.: Epoxides as microsomal metabolites
of polycyclic hydrocarbons.
FEBS Letters 18, 76-80 (1971)

- GROVER, P.L., SIMS, P.: Enzyme-catalysed reactions of polycyclic hydrocarbons with deoxyribonucleic acid and protein in vitro. *Biochem J.* 110, 159-160 (1968)
- GUENGERICH, F.P.: Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 252, 3970-3979 (1977)
- HARDING, B.W., WONG, S.H., NELSON, D.H.: Carbon monoxide-combining substances in rat adrenal. *Biochim. Biophys. Acta* 92, 415-417 (1964)
- HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.N., KREBS, H.A.: Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem J.* 101, 284-292 (1966)
- HILDEBRANDT, A.G., LEISMAN, K.C., ESTABROOK, R.W.: Aetyrapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P-450 from rats treated with phenobarbital. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 477-485 (1969)
- HOLDER, G.M., YAGI, H., JERINA, D.M., LEVIN, W., LU, A.Y.H., CONNEY, A.H.: Metabolism of benzo(a)pyrene. Effect of substrate concentration and 3-methylcholanthrene pretreatment on hepatic metabolism by microsomes from rats and mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 170, 557-566 (1975)
- HUSERMAN, E., SACHS, L., YANG, S.K., GELBOIN, H.V.: Identification of mutagenic metabolites of benzo(a)pyrene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 607-611 (1976)
- IQBAL, Z.M., YOSHIDA, A., EPSTEIN, S.S.: Uptake and excretion of benzo(a)pyrene and its metabolites by the rat pancreas. *Drug Metab. Dispos.* 7, 44-48 (1979)
- IVANOVIC, V., GEACINTOV, N.E., YAMASAKI, H., WEINSTEIN, I.B.: DNA and RNA adducts formed in hamster embryo cell cultures exposed to benzo(a)pyrene. *Biochemistry* 17, 1597-1603 (1978)

- JEFFREY, A.M., WEINSTEIN, I.B., JENNETTE, K.W., GRZESKOWIAK, K.,
NAKANISHI, K.: Structures of benzo(a)pyrene-nucleic acid adducts
formed in human and bovine bronchial explants.
Nature 269, 348-350 (1977)
- JERINA, D.M., DALY, J.W.: Arene oxides: a new aspect of drug meta-
bolism.
Science 185, 573-582 (1974)
- JERNSTRÖM, B., VADI, H., ORRENIUS, S.: Formation in isolated rat
liver microsomes and nuclei of benzo(a)pyrene metabolites that
bind to DNA.
Cancer Res. 36, 4107-4113 (1976)
- JONEN, H.G., HÜTHWOHL, B., KAHL, R., KAHL, G.F.: Influence of
pyridine and some pyridine derivatives on spectral properties
of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing acti-
vity.
Biochem. Pharmac. 23, 1319-1329 (1974)
- KAHL, G.F., MÜLLER, U., KAHL, R., JONEN, H.G., NETTER, K.J.:
Differential inhibition of biphenyl hydroxylation in perfused
rat liver.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 304, 297-301 (1978)
- KAHL, R., JONEN, H.G., KAHL, G.F.: Effect of phenobarbital and
3-methylcholanthrene administration in vivo and isooctane
extraction in vitro on metyrapone binding to reduced cyto-
chrome P-450.
Biochem. Pharmac. 23, 2305-2314 (1974)
- KATAGIRI, M., GANGULI, B.N., GUNSALUS, I.C.: A soluble cytochrome
P-450 functional in methylene hydroxylation.
J. Biol. Chem. 243, 3543-3546 (1968)
- KELLERMANN, G., LUYTEN-KELLERMANN, M., SHAW, C.R.: Genetic varia-
tion of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes.
Amer. J. Hum. Genet. 25, 327-331 (1973)

- KING, H.W.S., OSBORNE, M.R., BROOKES, P.: The in vitro and in vivo reaction at the N⁷-position of guanine of the ultimate carcinogen derived from benzo(a)pyrene.
Chem.-Biol. Interactions 24, 345-353 (1979)
- KING, H.W.S., THOMPSON, M.H., BROOKES, P.: The benzo(a)pyrene deoxyribonucleoside products isolated from DNA after metabolism of benzo(a)pyrene by rat liver microsomes in the presence of DNA.
Cancer Res. 34, 1263-1269 (1975)
- KING, H.W.S., THOMPSON, M.H., BROOKES, P.: The role of 9-hydroxy-benzo(a)pyrene in the microsome mediated binding of benzo(a)-pyrene to DNA.
Int. J. Cancer 18, 339-344 (1976)
- KINOSHITA, N., GELBOIN, H.V.: The role of aryl hydrocarbon hydroxylase in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene skin tumorigenesis: on the mechanism of 7,8-benzoflavone inhibition of tumorigenesis.
Cancer Res. 32, 1329-1339 (1972)
- KINOSHITA, N., GELBOIN, H.V.: Aryl hydrocarbon hydroxylase and polycyclic hydrocarbon tumorigenesis: effect of the enzyme inhibitor 7,8-benzoflavone on tumorigenesis and macromolecule binding.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 824-828 (1972 a)
- KIRBY, K.S., COOK, E.A.: Isolation of deoxyribonucleic acid from mammalian tissues.
Biochem J. 104, 254-257 (1967)
- KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-386 (1958)
- KUROKI, T., HEIDELBERGER, C.: The binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to the DNA, RNA, and proteins of transformable cells in culture.
Cancer Res. 31, 2168-2176 (1971)

- LIDDLE, G.W., ISLAND, D., LANCE, E.M., HARRIS, A.P.: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation. *J. Clin. Endocr.* 18, 906-912 (1958)
- LINDNER, E.: Karzinogene in geräucherten und stark gegrillten Nahrungsmitteln. In: *Toxikologie der Nahrungsmittel* (E. Lindner), pp. 112-114. Stuttgart 1974
- LITWACK, G., KETTERER, B., ARIAS, I.M.: Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature* 234, 466-467 (1971)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- MADYASTHA, K.M., MEEHAN, T.D., COSCIA, C.J.: Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant vinca rosea. *Biochemistry* 15, 1097-1102 (1976)
- MANNERING, G.J., DIXON, A.C., BAKER, E.M., ASAMI, T.: The in vivo liberation of morphine from codeine in man. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 111, 142-146 (1954)
- MARQUARDT, H., GROVER, P.L., SIMS, P.: In vitro malignant transformation of mouse fibroblasts by non-K-region dihydrodiols derived from 7-methylbenz(a)anthracene, 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene, and benzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 36, 2059-2064 (1976)
- MARQUARDT, H., HEIDELBERGER, C.: Influence of "feeder cells" and inducers and inhibitors of microsomal mixed-function oxidases on hydrocarbon-induced malignant transformation of cells derived from C3H mouse prostate. *Cancer Res.* 32, 721-725 (1972)

MASON, H.S.: Mechanisms of oxygen metabolism.

Advanc. Enzymol. 19, 79-233 (1957)

MASS, M.J., KAUFMAN, D.G.: (³H)Benzo(a)pyrene metabolism in tracheal epithelial microsomes and tracheal organ cultures.

Cancer Res. 38, 3861-3866 (1978)

McMANUS, M.E., ILETT, K.F.: Microsomal xenobiotic metabolism in marsupials.

Drug Metab. Dispos. 5, 503-510 (1977)

MILLER, L.L., BLY, C.G., WATSON, M.L., BALE, W.F.: The dominant role of the liver in plasma protein synthesis.

J. Exp. Med. 94, 431-453 (1951)

MUELLER, G.C., MILLER, J.A.: The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: the intracellular distribution of the enzyme system and its requirement for triphosphopyridine nucleotide.

J. Biol. Chem. 180, 1125-1136 (1949)

NEBERT, D.W., HEIDEMA, J.K., STROBEL, H.W., COON, M.J.: Genetic expression of aryl hydrocarbon hydroxylase induction. Genetic specificity resides in the fraction containing cytochromes P₄₄₈ and P₄₅₀.

J. Biol. Chem. 248, 7631-7636 (1973)

NEBERT, D.W., BOOBIS, A.R., YAGI, H., JERINA, D.M., KOURI, R.E.:

Genetic differences in benzo(a)pyrene carcinogenic index in vivo and in mouse cytochrome P₄₅₀-mediated benzo(a)pyrene metabolite binding to DNA in vitro. In: Biological Reactive Intermediates (D.J. Jollow, J.J. Kocsis, T. Snyder, H. Vainio, eds.), pp. 125-147. New York: Plenum Press 1977

NEMOTO, N., GELBOIN, H.V.: Enzymatic conjugation of benzo(a)pyrene oxides, phenols and dihydrodiols with UDP-glucuronic acid.

Biochem. Pharmacol. 25, 1221-1226 (1976)

NORDENSKJÖLD, M., SÖDERHÄLL, S., MOLOÉUS, P., JERNSTRÖM, B.:

Differences in the repair of DNA strand breaks induced by 9-hydroxy-benzo(a)pyrene and trans-7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-benzo(a)pyrene in cultured human fibroblasts.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1535-1541 (1978)

OESCH, F.: Mammalian epoxide hydrases: inducible enzymes cata-

lysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds.

Xenobiotica 3, 305-340 (1973)

OESCH, F., JERINA, D.M., DALY, J.W., RICE, J.M.: Induction, activation and inhibition of epoxide hydrase: an anomalous prevention of chlorobenzene-induced hepatotoxicity by an inhibitor of epoxide hydrase.

Chem.-Biol. Interactions 6, 189-202 (1973)

OESCH, F., KAUBISCH, N., Jerina, D.M., DALY, J.W.: Hepatic epoxide hydrase. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors.

Biochemistry 10, 4858-4866 (1971)

OMURA, T., SATO, R.: A new cytochrome in liver microsomes.

J. Biol. Chem. 237, PC 1375-1376 (1962)

OMURA, T., SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.

J. Biol. Chem. 239, 2379-2385 (1964)

OSBORNE, M.R., THOMPSON, M.H., TARMY, E.M., BELAND, F.A.,

HARVEY, R.G., BROOKES, P.: The reaction of 7,8-dihydroxybenzo(a)pyrene-9,10-oxide with DNA in relation to the benzo(a)pyrene-DNA products isolated from cells.

Chem.-Biol. Interactions 13, 343-348 (1976)

PELKONEN, O., BOOBIS, A.R., YAGI, H., JERINA, D.M., NEBERT, D.W.:

Tentative identification of benzo(a)pyrene metabolite-nucleoside complexes produced in vitro by mouse liver microsomes.

Mol. Pharmacol. 14, 306-322 (1978)

- PEZZUTO, J.M., LEA, M.A., YANG, C.S.: Binding of metabolically activated benzo(a)pyrene to nuclear macromolecules.
Cancer Res. 36, 3647-3653 (1976)
- PITOT, H.C., HEIDELBERGER, C.: Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis.
Cancer Res. 23, 1694-1700 (1963)
- PRICE, J.M., MILLER, E.C., MILLER, J.A., WEBER, G.W.: Studies on the intracellular composition of livers from rats fed various aminoazo dyes. II. 3'-Methyl-, 2'-methyl, and 2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene, 3-methyl-4-monomethylaminoazobenzene, and 4'-fluoro-4-dimethylaminoazobenzene.
Cancer Res. 10, 18-27 (1950)
- RAW, I., MAHLER, H.R.: Studies of electron transport enzymes. III. Cytochrome b_5 of pig liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 234, 1867-1873 (1959)
- REMMER, H., ESTABROOK, R.W., SCHENKMAN, J., GREIM, H.: Reaction of drugs with microsomal liver hydroxylase: its influence on drug action.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 259, 98-116 (1968)
- ROSS, B.D.: Perfusion techniques in biochemistry. A laboratory manual in the use of isolated perfused organs in biochemical experimentation. Oxford: Clarendon Press 1972
- RUCKPAUL, K.: The molecular organization of the liver microsomal monooxygenatic system.
Pharmazie 33, 310-312 (1978)
- RYAN, D.E., THOMAS, P.E., KORZENIOWSKI, D., LEVIN, W.: Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome P-450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene.
J. Biol. Chem. 254, 1365-1374 (1979)

- SCHIMASSEK, H.: Perfusion of isolated rat liver with a semi-synthetic medium and control of liver function.
Life Sci. 11, 629-634 (1962)
- SCHMÄHL, D.: Chemische Carcinogene in der Umwelt des Menschen unter besonderer Berücksichtigung des 3,4-Benzpyrens, "natürlicher" Carcinogene und potentiell carcinogener Arzneimittel.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 18, 964-970 (1968)
- SCHMIDT, F., FRITZ, W.: Zur Genese des Magenkrebses. II. Die Bedeutung kanzerogener Kohlenwasserstoffe in Nahrungsmitteln. Mitteilungsdienst Ges. Bek. Krebskrankh. 5, 15-30 (1968)
- SCHNEIDER, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In: Methods in enzymology, Vol. III (S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds.), pp. 680-684. New York-London: Academic Press 1957
- SCHULTZEN, O., NAUNYN, B.: Ueber das Verhalten der Kohlenwasserstoffe im Organismus.
Arch. Anat. Physiol. 349-357 (1867)
- SEIFRIED, H.E., BIRKETT, D.J., LEVIN, W. LU, A.Y.H., CONNEY, A.H., Jerina, D.M.: Metabolism of benzo(a)pyrene. Effect of 3-methylcholanthrene pretreatment on metabolism by microsomes from lungs of genetically "responsive" and "nonresponsive" mice.
Arch. Biochem. Biophys. 178, 256-263 (1977)
- SHINDHARA, K., CERUTTI, P.A.: Excision repair of benzo(a)pyrene-deoxyguanosine adducts in baby hamster kidney 21/C13 cells and in secondary mouse embryo fibroblasts C57BL/6J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 979-983 (1977)
- SIMS, P., GROVER, P.L., SWAISLAND, A., PAL, K., HEWER, A.: Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide.
Nature 252, 326-328 (1974)

- SLADEK, N.E., MANNERING³, G.J.: Evidence for a new P-450 hemo-protein in hepatic microsomes from methylcholanthrene treated rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 668-674 (1968)
- SLAGA, T.J., BRACKEN, W.M., VIAJE, A., BERRY, D.L., FISCHER, S.W., MILLER, D.R., LEVIN, W., CONNEY, A.H., YAGI, H., JERINA, D.M.: Tumor initiating and promoting activities of various benzo(a)-pyrene metabolites in mouse skin. In: Carcinogenesis, Vol. 3: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (P.W. Jones, R.I. Freudenthal, eds.), pp. 371-382. New York: Raven Press 1978
- STOCKS, P.: Cancer mortality in relation to national consumption of cigarettes, solid fuel, tea and coffee.
Brit. J. Cancer 24, 215-225 (1970)
- STRITTMATTER, C.F., BALL, E.G.: The intracellular distribution of cytochrome components and of oxidative enzyme activity in rat liver.
J. Cellul. Comp. Physiol. 43, 57-78 (1954)
- SWEAT, M.L., ALDRICH, R.A., DE BRUIN, C.H., FOLKES, W.L., HEISELT, L.R., MASON, H.S.: Incorporation of molecular oxygen into 11 β -position of corticosteroids.
Fed. Proc. 15, 367 (1956)
- TAKAHASHI, G., SHAH, H., WEINHOUSE, S.: Metabolism of (³H)-3-Methylcholanthrene in the perfused rat liver.
Cancer Res. 37, 369-375 (1977)
- THOMAS, P.E., LU, A.Y.H., RYAN, D., WEST, S.B., KAWALEK, J., LEVIN, W.: Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P-448.
J. Biol. Chem. 251, 1385-1391 (1976)
- THOMPSON, M.H., KING, H.W.S., OSBORNE, M.R., BROOKES, P.: Rat liver microsome-mediated binding of benzo(a)pyrene metabolites to DNA.
Int. J. Cancer 17, 270-274 (1976)

- THORGEIRSSON, S.S., NEBERT, D.W.: The Ah locus and the metabolism of chemical carcinogens and other foreign compounds.
Adv. Cancer Res. 25, 143-193 (1977)
- ULLRICH, V.: Die Rolle des Cytochrom P450 bei der Aktivierung von Pharmaka.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27, 1821-1827 (1977)
- VÄHÄKANGAS, K., NEBERT, D.W., PELKONEN, O.: The DNA binding of benzo(a)pyrene metabolites catalysed by rat lung microsomes in vitro and in isolated perfused rat lung.
Chem.-Biol. Interactions 24, 167-176 (1979)
- VÄHÄKANGAS, K., NEJASAARI, K., PELKONEN, O., KÄRKI, M.T.: The metabolism of benzo(a)pyrene in isolated perfused lungs from variously-treated rats.
Acta Pharmacol. Toxicol. 41, 129-140 (1977)
- WADA, F., SHIBATA, H., GOTO, M., SAKAMOTO, Y.: Participation of the microsomal electron transport system involving cytochrome P-450 in ω -oxidation of fatty acids.
Biochim. Biophys. Acta 162, 518-524 (1968)
- WATTENBERG, L.W.: Dietary modification of intestinal and pulmonary aryl hydrocarbon hydroxylase activity.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23, 741-748 (1972)
- WATTENBERG, L.W., LEONG, J.L.: Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavones.
Cancer Res. 30, 1922-1925 (1970)
- WATTENBERG, L.W., PAGE, M.A., LEONG, J.L.: Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds.
Cancer Res. 28, 934-937 (1968)
- WICKRAMASINGHE, R.H., VILLEE, C.A.: Early role during chemical evolution for cytochrome P450 in oxygen detoxification.
Nature 255, 509-511 (1975)

- WIESEL, F.J., LEUTZ, J.C., DIAMOND, L., GELBOIN, H.V.: Aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in microsomes from rat tissues: differential inhibition and stimulation by benzoflavones and organic solvents.
Arch. Biochem. Biophys. 144, 78-86 (1971)
- WILLIAMS, R.T.: Introduction: Pathways of drug metabolism.
In: Handbuch der exp. Pharmakologie, Vol. XXVIII/2
(B.S. Brodie, J.R. Gillette, eds.), pp. 226-242. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1971
- WISLOCKI, P.G., WOOD, A.W., CHANG, R.L., LEVIN, W., YAGI, H., HERNADEZ, O., JERINA, D.M., CONNEY, A.H.: High mutagenicity and toxicity of a diol epoxide derived from benzo(a)pyrene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1006-1012 (1976)
- WOOD, A.W., LEVIN, W., LU, A.Y.H., YAGI, H., HERNADEZ, O., JERINA, D.M., CONNEY, A.H.: Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene derivatives to mutagenic products by highly purified hepatic microsomal enzymes.
J. Biol. Chem. 251, 4882-4890 (1976)
- YANG, S.K., ROLLER, P.P., GELBOIN, H.V.: Mechanism of microsomal activation of benzo(a)pyrene to diol-epoxides: the separation and characterization of intermediates and products. In: Microsomes and drug oxidations (V. Ullrich et al., eds.), pp. 403-410. Oxford: Pergamon Press 1977
- ZANDER, R., LANG, W., WOLF, H.U.: Die schnelle einfache und mobile Messung der Sauerstoff-Konzentration des Blutes.
Biomed. Technik 22, 385-386 (1977)

L e b e n s l a u f

Am 19.12.1949 in Wiesbaden geboren. Besuch der Volksschule in Wiesbaden-Biebrich von 1956-1960, danach des altsprachlichen Gymnasiums Dilthey-Schule in Wiesbaden bis 1968.

Beginn des Biologiestudiums im Wintersemester 1968/69 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Vordiplom-Prüfung am 2.11.1971. Vom November 1973 bis März 1975 Anfertigung des experimentellen Teils der Diplomarbeit in den Neuropharmakologischen Laboratorien der Knoll AG, Ludwigshafen, bei Dr. H. Kreiskott. Diplom-Hauptprüfung am 24.2.1976.

Im Mai 1976 Beginn der Bearbeitung des vorliegenden Themas im Pharmakologischen Institut der Universität Mainz bei Prof. Dr. G.F. Kahl. Im Sommer 1977 Forschungsaufenthalt bei Dr. D.W. Nebert an den National Institutes of Health in Bethesda, Md., USA.

Seit März 1980 Tätigkeit in der Abteilung für Pharmakologie der Hoechst AG, Werk Hoechst.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit sind in folgenden
Publikationen veröffentlicht:

1. KAHL, G.F., KLAUS, E., JONEN, H.G., KAHL, R.: Enzymic control of irreversible binding of metabolically activated benzo(a)pyrene in perfused rat liver by monooxygenase activity.
Arch. Toxicol. 39, 149-159 (1977)
2. DECKERS-SCHMELZLE, B., KLAUS, E., KAHL, R., KAHL, G.F.: Binding of benzo(a)pyrene metabolites to cellular DNA in perfused rat lungs.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 303-307 (1978)
3. KAHL, G.F., KLAUS, E., LEGRAVEREND, C., NEBERT, D.W., PELKONEN, O.: Formation of benzo(a)pyrene metabolite-nucleoside adducts in isolated perfused rat and mouse liver and in mouse lung slices.
Biochem. Pharmac. 28, 1051-1056 (1979)

